

Inv. Pesq.	35 (2)	págs. 521-530	septiembre 1971
------------	--------	---------------	-----------------

Aparato de electroforesis vertical con gel de poliacrilamida*

por

J. M.^a CAMPS,** E. ARIAS** y C. MARTÍNEZ**

Una de las técnicas utilizadas, actualmente para la separación de macromoléculas en dispersión coloidal o pseudodisoluciones se fundamenta en la movilidad que adquieren dichas partículas cuando son sometidas a la acción de un campo eléctrico. Al depender esta movilidad de la naturaleza de las partículas que están en suspensión, de su tamaño, y de su carácter eléctrico, que está a su vez íntimamente ligado a su estructura, resulta posible la diferenciación de tales partículas en grupos bien diferenciados.

Esta técnica denominada electroforesis, ha abierto un amplio campo en el estudio de las proteínas y constituye modernamente un eficaz instrumento de investigación clínica.

En la práctica se utiliza como medios de dispersión y condensación diferentes geles constituidos por agar, almidón y actualmente por un gel polímero de acrilamida.

La preferente aceptación de los geles de acrilamida se debe a que su porosidad depende del grado de polimerización. Según sea el tamaño del poro, variará de hecho la viscosidad del medio, y con ello la velocidad relativa de los diferentes grupos de macromoléculas. Modificando el grado de polimerización, se facilita por lo tanto la separación de los distintos grupos moleculares en su continuado avance a través del medio de dispersión bajo la influencia del campo eléctrico.

* Recibido para su publicación el 12-XII-1969. El contenido de este trabajo se encuentra al amparo de las patentes números 375.958, «Aparato de electroforesis vertical múltiple con gel de poliacilamida» y 375.959, «Aparato de destendido para el proceso de electroforesis de disco», registradas por el Patronato «Juan de la Cierva».

** Instituto de Investigaciones Pesqueras. Paseo Nacional, s/n. BARCELONA-3.

Normalmente el polímero de acrilamida se dispone en forma de pequeños cilindros de 5 mm de longitud, o bien en forma de láminas de 5 a 7 mm de espesor. En ambos casos, el polímero debe formarse a partir del monómero por la acción química del persulfato en el mismo momento del análisis. Según la técnica de Davis se llenan pequeños tubos de vidrio con el líquido monómero y a continuación se polimerizan. Una vez formado el gel, los tubos de vidrio se insertan mediante tapones de goma en el fondo de una cubeta cilíndrica —cubeta superior— portadora de un cátodo central de grafito o platino. Los tubos de vidrio portadores de los geles, quedan regularmente distribuidos en torno al cátodo, y al sobresalir del fondo de dicha cubeta, vienen sumergidos, por su parte inferior, en el líquido anódico contenido en otra cubeta similar —cubeta inferior— con lo que queda cerrado el circuito.

En el procedimiento de Davis los tubos quedan agrupados formando un todo unitario con las cubetas. El potencial es también único para todos los tubos. En ello radica su principal inconveniente. En efecto, la preparación individual de cada polímero comporta una serie de operaciones muy delicadas especialmente la eliminación de los meniscos de separación de fases. De hecho resulta prácticamente imposible, tanto si se emplea el sistema de un solo polímero como cuando se opera con tres fases polímeras, obtener geles cilíndricos de longitud perfectamente igual. Ello ocasiona, al variar las resistencias individuales de los distin-

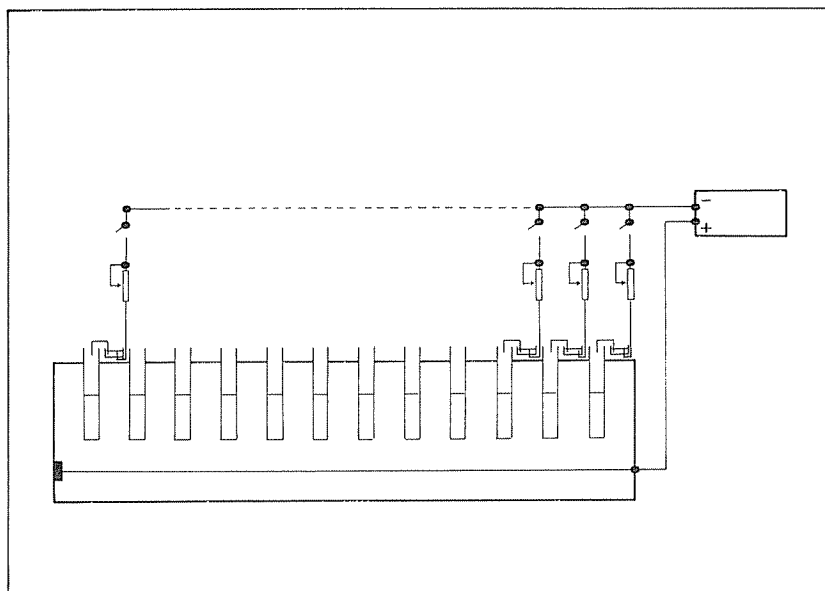


FIG. 1. — Esquema eléctrico del aparato de electroforesis de disco.

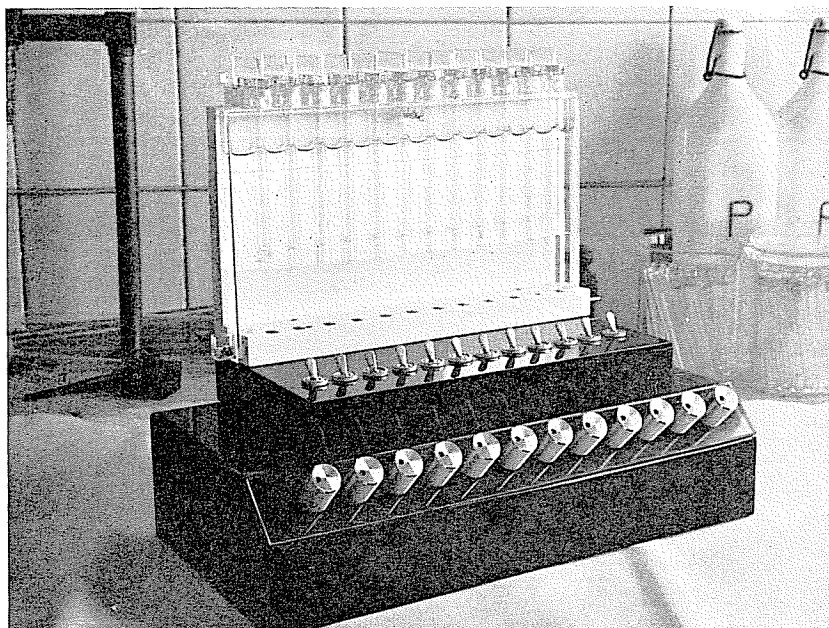


Fig. 2. — Vista del aparato de electroforesis.

tos geles, velocidades diferentes de migración en cada tubo, incluso dentro de una misma serie. La comparación de los electroforogramas se hace por ello difícil especialmente para aquellas bandas poco diferenciadas.

El método de placa tiende a solventar estas dificultades por cuanto al operar en un frente único, la velocidad de migración es idéntica en todos los ensayos. Sin embargo, la comparación de los electroforogramas de placas distintas, e incluso de una misma placa cuando no están próximos, resulta difícil. La manipulación de los geles es poco práctica debido a sus dimensiones. Su conservación y almacenamiento es difícil, por lo que resulta obligada su reproducción fotográfica; no obstante, este procedimiento no puede considerarse como solución ideal por cuanto difícilmente son visibles en las reproducciones fotográficas las bandas débilmente insinuadas. Asimismo, las placas deben tener, necesariamente, un considerable grosor, y ello obliga a emplear una considerable cantidad de material. La exigencia de una eficaz refrigeración para contrarrestar el calentamiento que se produce durante la electroforesis debido a la gran resistencia eléctrica que oponen dichas placas, es otro de los inconvenientes que se señalan.

El procedimiento que se describe se fundamenta en el hecho, experimentalmente comprobado, de que la bondad de un proceso electroforético depende en primer lugar de una determinada velocidad de migración

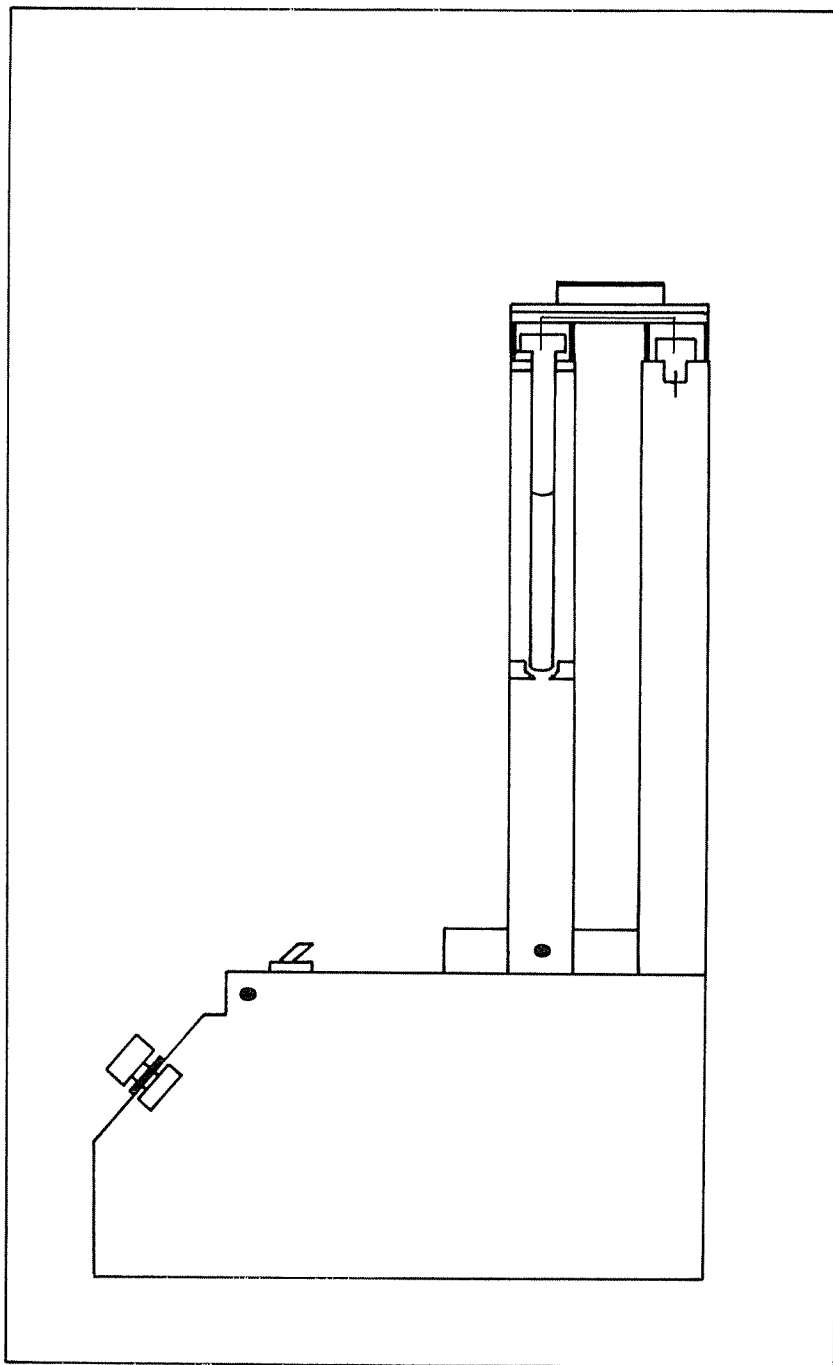


FIG. 3. — Corte transversal del mencionado aparato.

que puede considerarse límite. Velocidades superiores a esta velocidad límite, dan origen a una insuficiente definición de las bandas. Velocidades inferiores no ocasionan, dentro de un margen considerado práctico, la aparición de nuevas bandas como desdoblamiento de las anteriores, ni una mayor definición de éstas.

A este respecto, se disponen los distintos geles polímeros de tal forma que cada uno resulta independiente de los demás. Cada gel polímero queda a su vez conectado al circuito principal mediante un circuito propio que lleva intercalado en serie un potenciómetro de 25 K 5W y un interruptor de corriente. Si bien existe una fuente única de alimentación primaria de energía, los distintos geles polímeros quedan así sujetos a diferentes potenciales. Con esta disposición a los pocos minutos de haberse iniciado el proceso electroforético, observando las bandas de despla-

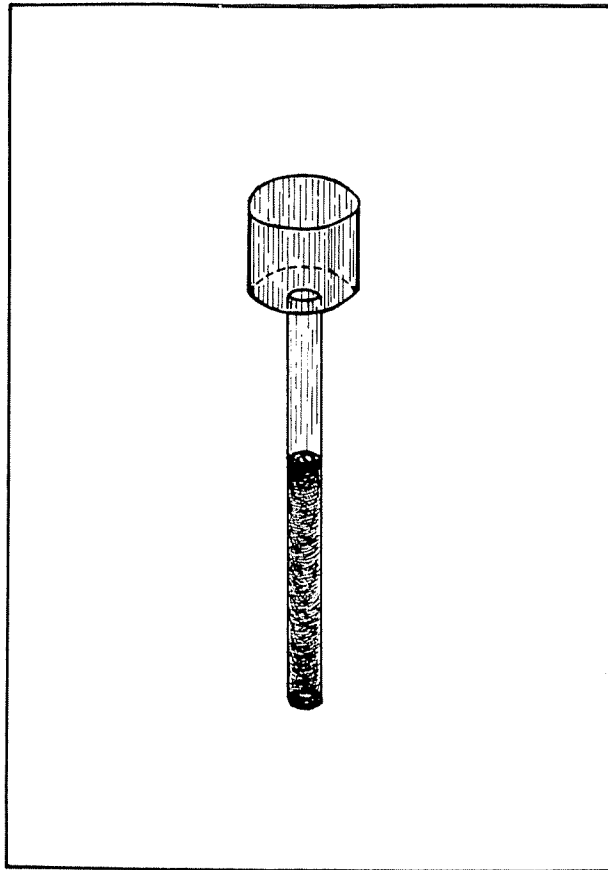


FIG. 4. — Tubo donde se efectúa el desarrollo electroforético.

zamiento de azul de bromofenol que constituye el frente de progresión, es posible regular el potencial particular de cada gel. Así es posible rectificar las distintas velocidades particulares, hasta aproximarlas a la velocidad límite a que antes se hizo referencia (figs. 1, 2, 3 y 4).

La posibilidad de independizar el proceso electroforético por elementos ofrece también la ventaja de facilitar la última operación de fijado y revelado. Efectivamente, al finalizar el proceso electroforético, debe procederse a la separación del polímero para fijar las proteínas, teñirlas y eliminar el exceso de colorante. Esta separación exige un tiempo bastante considerable si se tiene en cuenta que estas operaciones se realizan en series, como mínimo, de 12 elementos. Durante el transcurso de esta operación, y a consecuencia de la desaparición del campo eléctrico que orientaba las partículas, se produce un desplazamiento por difusión que puede afectar la perfecta delimitación de las bandas introduciendo un factor de inseguridad. Con el sistema propuesto, es posible disminuir el potencial, en esta fase final, y anular así la velocidad de migración manteniendo las partículas en un régimen prácticamente estático. Cada uno de los elementos puede entonces manipularse separadamente sin posibles alteraciones.

Finalizado el desarrollo electroforético, indicado por la banda de bromofenol, se detiene en cada tubo, y en un momento dado, la progresión

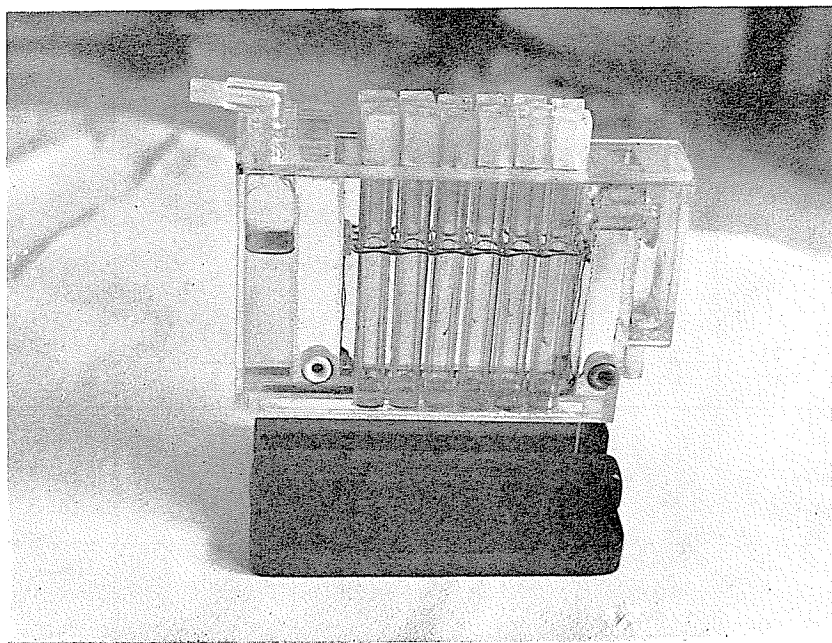


FIG. 5. — Aparato de decoloración.

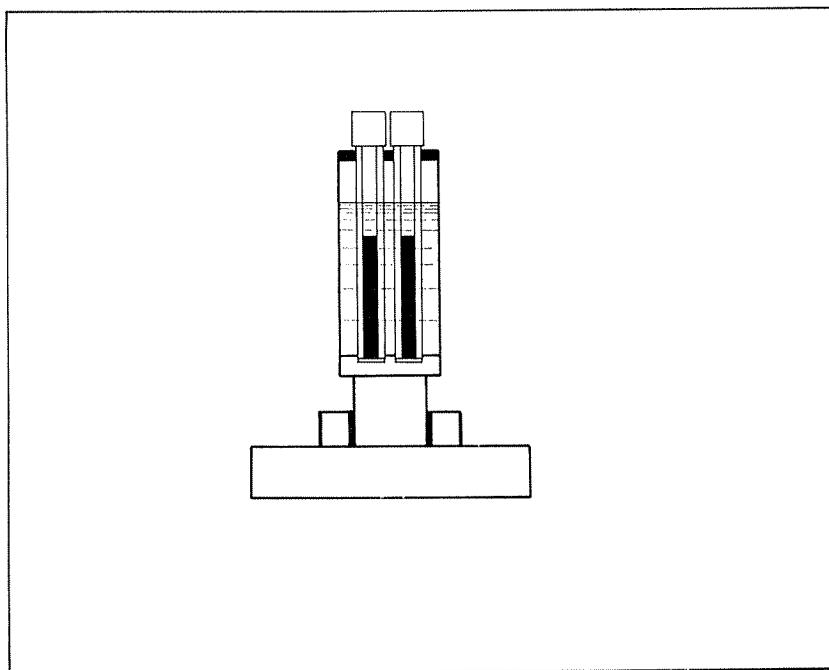


FIG. 6. — Corte transversal del aparato de decoloración.

del proceso mediante los interruptores de circuito. En estas condiciones los electroforegramas resultan perfectamente comparables al alcanzarse en todos ellos idéntica longitud de recorrido.

Otra innovación consiste en el sistema de decoloración por vía transversal y en contracorriente con el electrolito de lavado, el cual se expone a continuación.

Finalizada la extensión electroforética, se realiza el fijado y teñido de las bandas. Para ello una vez extraídos los cilindros de polímero de los tubos que los contenían, se sumergen durante una hora en una disolución acética de amido Schwarz. A continuación se procede a la decoloración o extracción del exceso de colorante no fijado por las proteínas, con lo que se ponen de manifiesto las bandas constituidas por los proteidos fijados y coloreados (figs. 5, 6 y 7).

La eliminación de colorante no fijado se realiza comúnmente mediante otro proceso de electroforesis. Los cilindros de polímero son colocados en tubos de vidrio y sometidos a un campo eléctrico. La disposición adoptada en los sistemas antiguos, comporta que las migraciones de colorante no fijado se realicen en el sentido longitudinal de los cilindros. Los potenciales aplicados no pueden ser muy elevados, debido a que se

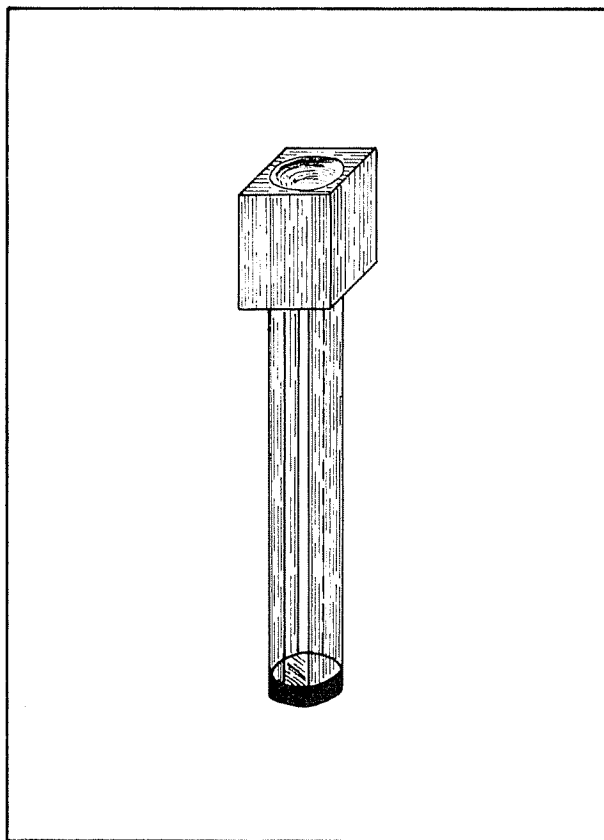


FIG. 7. — Tubo empleado para la decoloración del cilindro.

podría producir desplazamientos forzados de las bandas. La operación de decoloración exige, por este motivo, un tiempo bastante considerable.

En la presente innovación los cilindros del polímero, que deben someterse a la operación de decoloración, son introducidos en unas pequeñas cubetas tubulares de material plástico que poseen unas aberturas laterales en su sentido axial. Estas cubetas tubulares se disponen en el interior de un recipiente que contiene el electrolito, y en situación perpendicular a las líneas del campo eléctrico creado por dos electrodos situados en dicho recipiente. En estas condiciones la migración del colorante se realiza en el sentido transversal de los cilindros. Al ser menor el camino recorrido por las moléculas del colorante la duración del proceso de decoloración se acorta considerablemente.

Por otra parte la migración transversal impide toda posible alteración

de la posición de las bandas incluso operando a altos potenciales lo que redundará en una mayor rapidez de la operación.

Asimismo, se hace circular el líquido electrolito en sentido inverso a la dirección del desplazamiento electroforético del colorante. Con el fin de asegurar durante la operación de decoloración el completo aislamiento de la cubeta electrolítica, se adapta a ella tanto a la entrada como a la salida del electrolito, unos dispositivos de goteo continuo.

Con el fin de aclarar cuanto queda expuesto en la figura 1 se representa el esquema del circuito eléctrico del aparato de desarrollo electroforético en el que se muestra la cubeta anódica; el electrodo de platino; los tubos de electroforesis de disco; los puentes de platino (cátodo) con los contactos de mercurio; los potenciómetros de 25 K 5 W; los interruptores de circuito y la fuente de alimentación.

CONCLUSIONES

1.º Se trata de un aparato para la electroforesis de disco caracterizado porque los elementos que actúan como medios de dispersión integrados por geles polímeros en forma de pequeños cilindros o pequeños paralelepípedos de sección poligonal, constituyen circuitos independientes, conectados en derivación a un circuito de alimentación principal.

2.º Cada uno de los circuitos individuales en que se integra cada elemento consta del cilindro de polímero gel, un potenciómetro, regulador del potencial de cada elemento y un interruptor de circuito.

3.º Se caracteriza porque los elementos se conectan en su parte catódica al circuito principal mediante unos puentes móviles de platino u otros conductores y a través de contactos de mercurio. Esta disposición permite la desconexión y manipulación de cada elemento como unidad independiente.

4.º El dispositivo de decoloración de los cilindros de polímero gel, permiten la extracción del colorante no fijado, en el sentido transversal de los cilindros, de tal forma que la dirección electroforética del colorante es opuesta al movimiento del electrolito en el interior de la cubeta de decoloración.

SUMMARY

A VERTICAL GEL ELECTROPHORESIS APPARATUS IS DESCRIBED. — Buffer reservoir, wich contain an electrode of platinum (anode), should be made from an inert, no conductive material suchas polystyrene or glass.

Container for the gel columns are out from cylindrical glass or plastic. Tubulars gel containers are conected in derivation to the main circuit.

Individual circuits are constituted for the tubular gel containers, one potencio-meter for 25 K 5 W, one switch for circuits and being united to principal circuit (cathode) for platinum points.

Following fixation and staining, the umbound dye is removed from the gel inter-vening an apparatus wich is described in the work.

BIBLIOGRAFÍA

- DAVIS, BARUCH J. — 1964. Disc electrophoresis II Method and aplication to human serum proteins. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 121: 404-427.
- WOOD-WORTH, R. y LESLIE G. CLARK. — 1967. An improved vertical polycrylamide gel electrophoresis apparatus. *Analytical Biochem.* 18, 295-304.