

ELECTROFORÉISIS: FUNDAMENTOS, AVANCES Y APLICACIONES

Electrophoresis: fundamentals, advances and applications

EPISTEMUS

ISSN: 2007-8196 (electrónico)

ISSN: 2007-4530 (impresa)

Montalvo Navarro Carlos Antonio¹
Lugo Flores Marco Antonio²

Recibido: 20 de septiembre de 2016,
Aceptado: 30 de noviembre de 2016

Autor de Correspondencia:
Lic. Montalvo Navarro Carlos Antonio
Correo: carmona1994@gmail.com

Resumen

La electroforéisis es una técnica para separación de biomoléculas según su movilidad y naturaleza (generalmente ácidos nucleicos o proteínas) en un campo eléctrico sobre una matriz porosa, cuya composición depende de la biomolécula a analizar. Para la separación de ácidos nucleicos se utilizan matrices de agarosa y para la separación de proteínas se utilizan matrices de poliacrilamida. Esta técnica representa una herramienta fundamental de análisis cuantitativos en diversos campos de ciencias biológicas como biología molecular, bioquímica o proteómica. Entre las distintas plataformas de electroforéisis, las más utilizadas en análisis de ácidos nucleicos son la electroforéisis en gel de agarosa, la electroforéisis de campo pulsado (PFGE) o la electroforéisis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), y las más utilizadas para análisis de proteínas son la electroforéisis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS) y la electroforéisis bidimensional. Esta revisión discutirá las técnicas previamente mencionadas y sus recientes aplicaciones.

Palabras clave: electroforéisis, ADN, PAGE, PFGE, DGGE

Abstract

Electrophoresis is a technique for separating biomolecules according to their mobility and nature (usually nucleic acids or proteins) in an electric field on a porous matrix, whose composition depends on the biomolecule to be analyzed. For the separation of nucleic acids, agarose matrices are used and for the separation of proteins, polyacrylamide matrices are used. This technique represents a fundamental tool of quantitative analysis in various fields of biological sciences such as molecular, biochemical or proteomic biology. Among the different electrophoresis platforms, the most used in nucleic acid analysis are agarose gel electrophoresis, pulsed field electrophoresis (PFGE) or denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and the most used for analysis of proteins are polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS) and two-dimensional electrophoresis. This review will discuss the previously mentioned techniques and their recent applications.

Keywords: electrophoresis, DNA, PAGE, PFGE, DGGE.

¹ Universidad autónoma de baja california: campus ensenada Correo: carmona1994@gmail.com

² Instituto tecnológico de los Mochis Correo: marco_lugo029@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son un grupo de seres vivos que se encuentran en una gran variedad de lugares como lo son las plantas, animales y humanos en donde coexisten con el huésped ayudando a realizar un sin fin de funciones. Sin embargo, algunos de estos como los microorganismos patógenos pueden ocasionar enfermedades en los organismos mencionados provocando la muerte de los mismos. Desde la perspectiva de la salud, en seres humanos es necesario establecer protocolos que permitan la identificación de estos agentes perjudiciales y prevenir el efecto patógeno que generan sobre las personas. El estudio del ADN de los microorganismos ha potenciado la identificación de estos a partir de diferentes técnicas moleculares, tal es caso de la electroforésis, una técnica que permite el procesamiento de los fragmentos de ADN que al ser regiones muy conservadas dentro de cada especie, es posible identificar a estos. El presente estudio proporciona información acerca del fundamento de la técnica de electroforésis, los procedimientos y reactivos requeridos para la misma, así como los avances y nuevas técnicas que han surgido con el paso del tiempo.

DESARROLLO

Métodos de separación de ácidos nucleicos.

Electroforésis en gel de agarosa. La creación de la electroforésis como un método de separación de ADN bicatenario de cadenas simples se remonta al año 1962, elaborado por Matsubara y Takagi, donde se utilizaba al almidón como gel de corrimiento. La necesidad de analizar moléculas de ADN de longitudes variables propició el estudio de otros compuestos que pudieran utilizarse como gel de corrimiento en las pruebas de electroforésis, surgiendo la agarosa en 1969 como un candidato adecuado debido a las características que posee. La agarosa es un polisacárido obtenido del aislado de agar de algas rojas marinas, el cual está constituido por unidades repetidas de agarobiosa, sustituida de manera extensa en grupo éster de sulfato, ácido pirúvico cetil y ésteres metílicos. Dicho polímero es de interés en el análisis del ADN debido a las características que posee al ser gelificado, consiste en una bobina aleatoria estructurada por una doble hélice en etapas iniciales de la gelificación y a medida que avanza la gelificación se forman las dobles hélices finales. La configuración mencionada forma una red fibrosa que puede ser utilizada como filtro para la clasificación de diferentes moléculas, donde la concentración de agarosa es inversamente proporcional al tamaño del poro. Ha sido reportado un límite de tamaño máximo de fragmentos de ADN que pueden ser analizados con gel de agarosa, siendo entre 100 a 2000 pb a una concentración de 2-3% del polisacárido. Por otro lado la longitud mínima del fragmento se establece a valores superiores a 50 kb, donde la concentración recomendada es de 0.25% de agarosa [15]. La aplicación de la electroforésis con geles de agarosa se ha implementado una gran variedad de estudios como

lo es el ensayo de cometa esencial (ensayo de una sola célula). Dicha técnica es utilizada para determinar el daño o reparación del ADN en células eucariotas y tejidos disgregados a partir de la adición de la suspensión de células junto con la agarosa sobre el molde para formar el gel delgado. Después se realiza la lisis de las células con un detergente (Triton X-100) y NaCl 2M para la eliminación de histonas del ADN. Las moléculas que permanecen adheridas al gel reciben el nombre de nucleoides que se caracterizan por mantener el superenrollamiento del ADN. De acuerdo al modelo propuesto por Cook y col. En 1970, estipula que las moléculas de ADN están unidas a una matriz nuclear formando una secuencia donde cada unidad estructural genera un bucle. Entonces, al ocasionar rupturas de la cadena de ADN se dice que el superenrollamiento se relaja y al ser aplicado un campo electroforético, dicho bucle puede migrar hacia el ánodo de la cámara de electroforésis. A mayor cantidad de rupturas se presenta una mayor cantidad de ADN en la cola del cometa, que después de teñirse (4,6-diamidino-2-fenilindol), la intensidad relativa de la fluorescencia de la cola se mide como índice de frecuencia de ruptura del ADN por medio de microscopía de fluorescencia.

Aplicaciones. La aplicación de dicho ensayo abarca el estudio de células sanguíneas provenientes de animales o humanos, células de hemolinfa de moluscos e insectos, esperma, tejidos animales disgregados, levaduras, núcleos liberados de tejidos vegetales, en otras palabras es aplicable a cualquier tipo de célula eucariota que pueda obtenerse como una célula única [12].

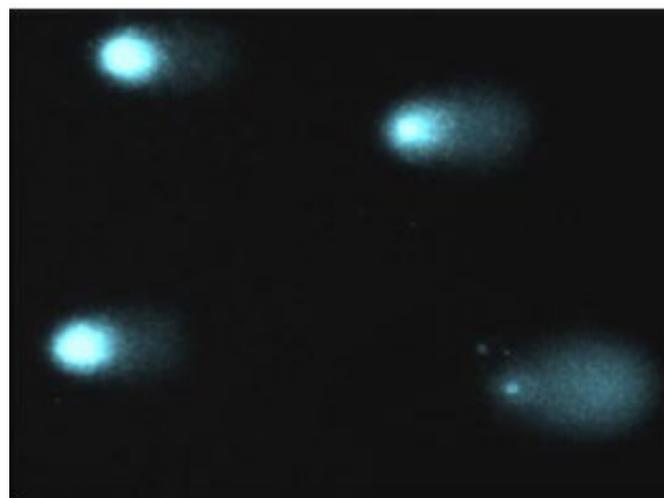
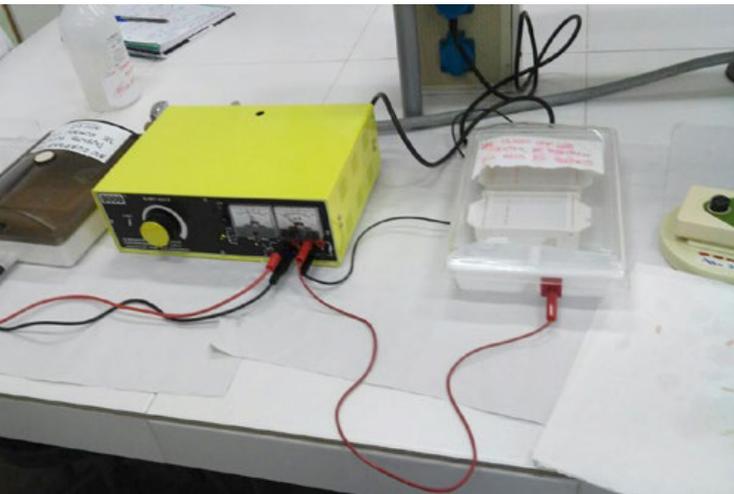
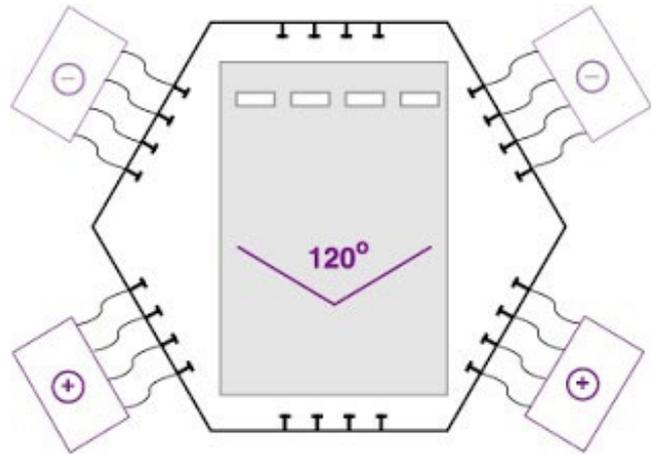


Figura 1. Imágenes de ensayo de cometa obtenidas por microscopía de fluorescencia

Electroforésis de campo pulsado (PFGE). El desarrollo y modificaciones de la electroforésis convencional permiten generar nuevas metodologías para mejorar el análisis e identificación de contenido genético de células eucariotas y procarionas. Schwartz y Cantor demostraron que la implementación de campos eléctricos podía ser utilizada



diferenciación de subtipos de bacterias, considerándose la técnica de oro para dicho proceso. Algunos ejemplos son: la medida y el número de cromosomas de DNA y/o enlace genético de grupos bacterianos como *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *Plasmodium*, etc [14].



aplicación de campos eléctricos en diferentes direcciones.

para la separación de moléculas largas de ADN por electroforésis en geles de agarosa. El principio de la técnica consiste en la aplicación de dos o más campos eléctricos en direcciones perpendiculares por lapsos de tiempo definidos, permitiendo alterar la dirección de las moléculas de DNA y orientándola a diferentes posiciones. Un aspecto importante a considerar en la técnica es la heterogeneidad de los pulsos generados por los campos eléctricos ya que esto permite la producción de un gradiente de intensidad de campo eléctrico a través de la longitud del gel y como consecuencia, líneas de campo eléctrico distorsionadas tomándose como pistas de migración de las moléculas de ADN en los carriles de los geles. Lo anterior permite separar los fragmentos de interés para su posterior análisis. Las medidas de las moléculas de interés definen el tiempo de aplicación requerido del campo eléctrico para reorientarlas, a mayor tamaño mayor tiempo de aplicación y viceversa para las moléculas de ADN pequeñas. La preparación de las muestras de ADN consiste en el cultivo de células correspondientes a 500 µg/mL de DNA, después son recolectadas y lavadas con solución isotónica para mantener la integridad de las mismas. Posteriormente, se agregan al gel de agarosa, se realiza una mezcla y el producto formado es vertido en el molde. El molde formado es sumergido en una solución con detergentes y agentes desproteinizantes que permiten al material genético estar listo para la aplicación de campos eléctricos. Después se lleva a cabo la electroforésis aplicando los campos eléctricos, donde previamente se requiere teñir al gel con un agente de intercalación fluorescente para la visualización del patrón, los más utilizados son: gel red, SYBR® gold, SYBR® gold y bromuro de etidio. Estos tintes permiten obtener patrones de intensidad de fluorescencia que son digitalizados y analizados de manera visual o mediante software.

Electroforésis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). La electroforésis en gel por gradiente desnaturalizante (DGGE) es una técnica usada para separar fragmentos cortos-medianos de DNA basado en sus características de fusión. Esta técnica ha sido frecuentemente utilizada para identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) sin la necesidad de secuenciación del DNA y como un método de huella molecular para comunidades en ecosistemas complejos, en particular con la amplificación de los genes de RNA ribosomal 16S debido a que es altamente conservado [9].

En el DGGE se utiliza un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente creciente de desnaturalizantes

Aplicaciones. A partir de la técnica mencionada se pueden analizar mezclas de ADN mayores a 20 kb y máximas a 5Mb mediante geles de agarosa que separan las moléculas de acuerdo a su tamaño [13]. PFGE permite el análisis de ADN intacto por lo que ha sido utilizado en la



químicos (generalmente urea o formamida) a través de los cuales el DNA migra por electroforesis. A medida que el DNA migra por el gradiente, cada molécula empezara a desnaturizarse a una concentración particular del desnaturizante dependiendo del %GC en la molécula y el orden de las bases en la secuencia. La migración de las moléculas se retardada cuando sucede la desnaturización. La técnica DGGE se representa esquemáticamente en la Fig. 3.

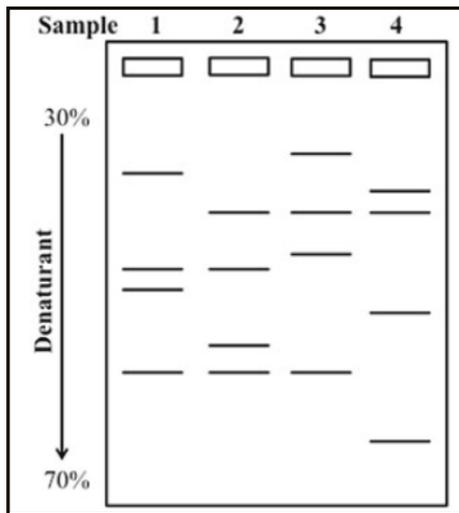


Figura 3. Diagrama esquemático de un DGGE

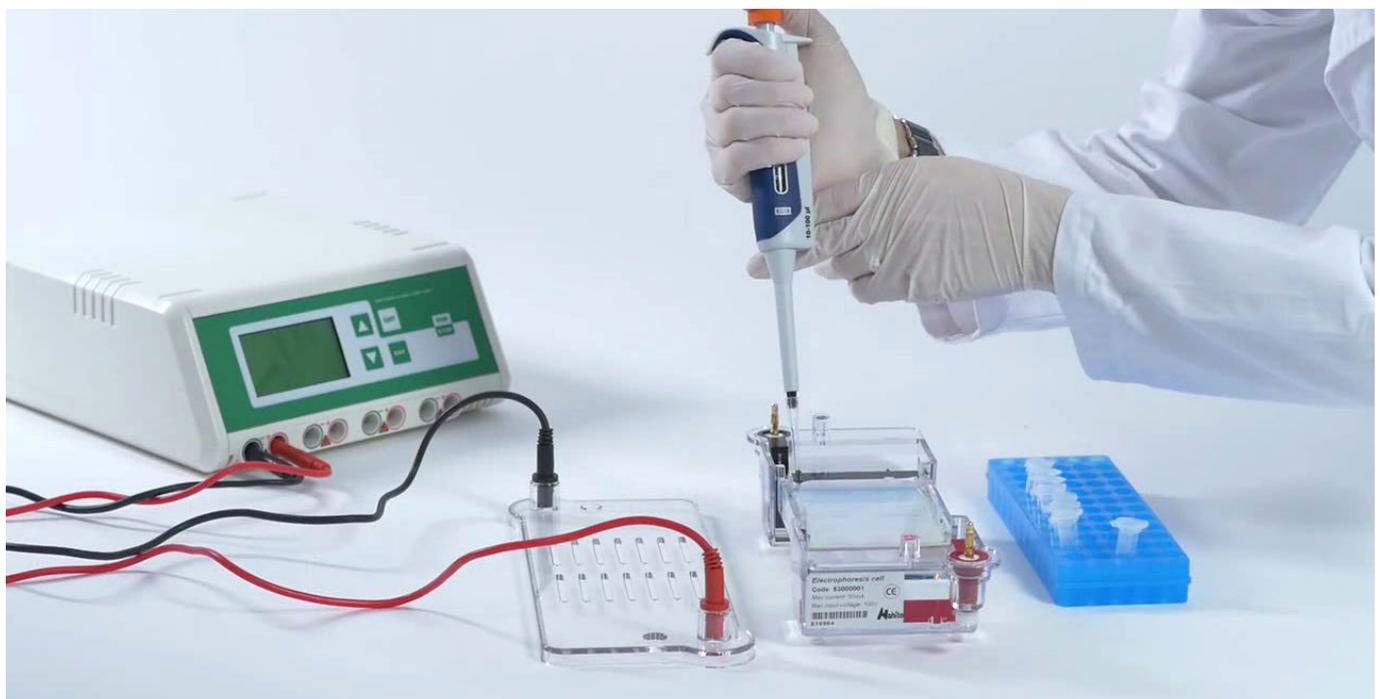
Un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente químico desnaturizante puede ser utilizado, en este caso la técnica es llamada Electroforesis en Gel con Gradiente de Temperatura (TGGE). Recientemente, DGGE se ha

convertido en una herramienta importante en la ecología microbiana, donde ha sido utilizado como método de huella molecular para evaluar la diversidad microbiana en comunidades con mezclas complejas de microorganismos.

Las investigaciones realizadas por Subasinghe et al., [10] para la identificación de bacterias en productos microbianos utilizaron la técnica de DGGE, y con ella encontraron que la formación de múltiples bandas en el gel representaban a una misma bacteria en lugar de un consorcio bacteriano. Esto fue atribuido a inconvenientes con el PCR elaborado previamente. Otro ejemplo de aplicación del DGGE fue el realizado por Xin et al., [11] en el análisis de comunidades bacterianas asociadas con pericoronitis asintomática y sintomática, una enfermedad bucal inflamatoria. El resultado del perfil bacteriano en pacientes clínicos mostro una menor diversidad de microorganismos que en los pacientes control (sin enfermedad), este descubrimiento sugirió que la microbiota asociada a pericoronitis se vuelve menos diversa, quizá debido a que ciertos grupos de microorganismos dominan en las biopelículas a medida que la pericoronitis progresa.

Métodos de separación de proteínas.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. Los gels de poliacrilamida son gels químicamente entrelazados formados por la reacción de acrilamida con un agente de entrecruzamiento bifuncional como el Bis [8]. La electroforesis con gels de poliacrilamida (PAGE) es útil para separar moléculas por tamaño-carga y hay muchos sistemas diferentes dependiendo de la muestra y



sus posteriores aplicaciones [2]. Las propiedades que debe tener un medio de soporte ideal son [6]:

- Naturaleza química inerte (no debe reaccionar con el analito o con cualquier reactivo utilizado)
- Alta conductividad eléctrica
- No debe absorber el analito
- Porosidad controlada para lograr un efecto de separación deseado
- Transparencia para lograr una tinción e imagen exitosa
- Baja toxicidad
- Fácil disponibilidad de los reactivos utilizados
- Rigidez razonable para un fácil manejo de la matriz
- Electroendoosmosis: flujo de un buffer a través de una superficie cargada

Los geles de poli(acrilamida) tienen todas las propiedades descritas anteriormente.

Formatos de PAGE. Varios formatos y versiones de PAGE han sido desarrolladas, como:

1. SDS-PAGE
2. Gradiente de SDS-PAGE
3. PAGE de Ácido acético – Urea para proteínas básicas
4. Gel de electroforésis discontinua con Bromuro de cetiltrimetilamonio
5. Electroforésis con enfoque isoelectrico
6. Electroforésis capilar
7. Electroforésis bidimensional

La popularidad de los geles de poli(acrilamida) proviene de varias propiedades fundamentales como claridad óptica, neutralidad eléctrica y disponibilidad en un amplio rango de porosidad. Su fórmula química, como comúnmente se polimeriza a partir de acrilamida y N, N'-metileno bisacrilamida (Bis), se muestra en la Fig. 4, junto con la de los dos catalizadores más ampliamente usados, el peroxodisulfato (amonio o potasio) y N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED) [6].

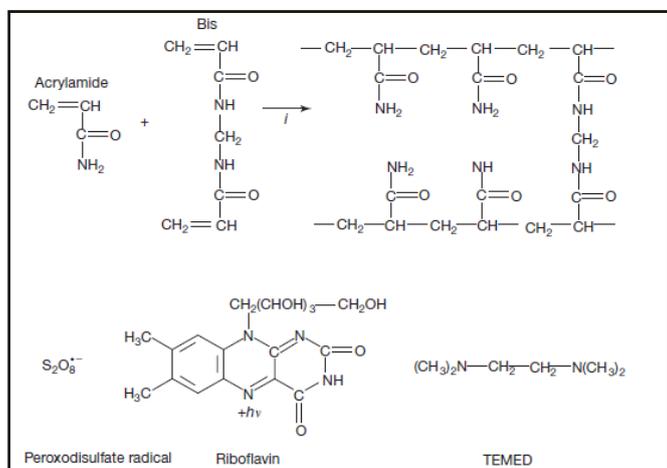
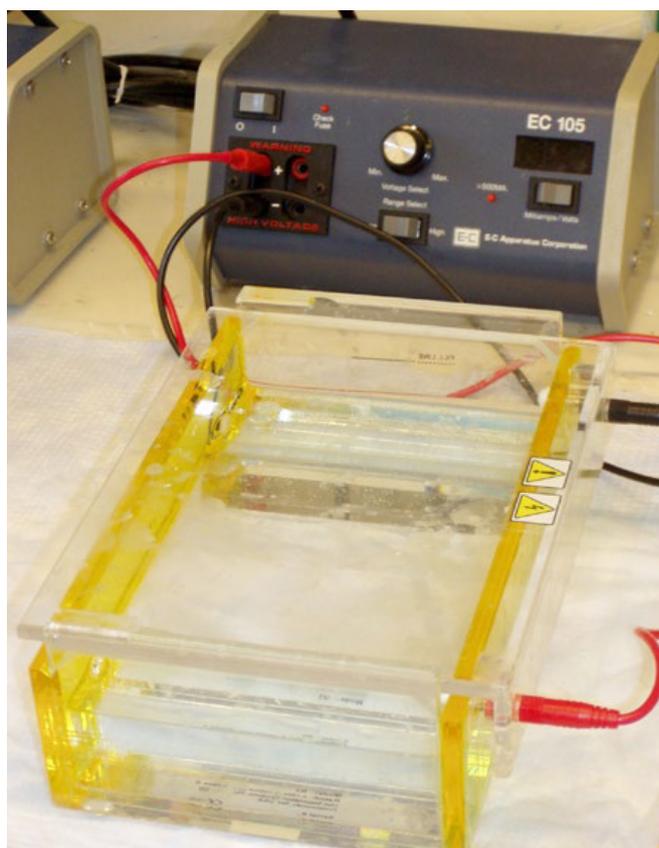


Figura. 4 Reacción de polimerización de la acrilamida e iniciadores de la polimerización.



Electroforésis en gel de poli(acrilamida) con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). SDS es un detergente que desnaturaliza estructuras secundarias y estructuras terciarias no enlazadas con disulfuro y las reviste con una carga negativa que se correlaciona con su longitud, permitiendo que los pesos moleculares sean estimados. La movilidad a través del gel puede verse afectada por el estado de la proteína (por ejemplo, fosforilación y presencia de moléculas multiméricas) [2]. La electroforésis SDS fue el siguiente paso lógico después de la electroforésis discontinua. Mientras que esta última discrimina las macromoléculas en función del tamaño y la carga superficial, la electroforésis SDS fracciona las cadenas polipeptídicas esencialmente en función de su tamaño. Por lo tanto, es un método simple, pero poderoso y confiable para la determinación de la masa molecular.

La muestra de proteína (1 mg/mL) generalmente se desnaturaliza en 100 mmol/L fosfato pH 7.0, que contiene 1% SDS, 1% 2-mercaptoetanol, 5% -10% de sacarosa (para aumentar la densidad de la muestra para cargar el gel) y trazas de bromofenol azul (como un colorante de rastreo para monitorear la formación de límites en sistemas discontinuos y para verificar la terminación de la corrida). Después calentando a 100°C durante 5 minutos, la muestra se deposita generalmente en posillos en la placa de gel [6].

Para detectar las bandas se realiza una tinción con varios reagentes. Después de la tinción, las bandas pueden ser cuantificadas por densitometría. Adicionalmente a la



detección de proteínas, métodos de detección específica han sido desarrollados para tinción de motivos de lípidos y carbohidratos, así como para tinción de actividad biológica y detección de anticuerpos por sondas.

Aplicaciones. Magdy y Maged [4] utilizaron la técnica de SDS-PAGE para validar un método de estimación cuantitativa de la enzima digestiva papaína en formulaciones farmacéuticas (tabletas, capsulas y jarabes) comercializadas en mercados egipcios. Los resultados obtenidos demostraron que la cantidad de papaína obtenida por SDS-PAGE fué menor que la cantidad indicada en los envases de producto en presentación de tabletas y capsulas.

Otro estudio donde se utilizó la técnica SDS-PAGE es el reportado por Min-Kyoung et al., [3] en el cual investigaron el patrón de bandeo de azúcares reductores, péptidos totales e isoflavonoides presentes en tofu congelado y descongelado fermentado con *B. subtilis*, así como la digestibilidad y el contenido de fenoles totales en el tofu.

Electroforesis bidimensional. La electroforesis en 2D es una técnica clásica capaz de dar una imagen extendida de las proteínas presentes en una muestra de interés. Se basa en una primera separación por el punto isoeléctrico de la proteína, seguido de una separación por peso molecular utilizando SDS-PAGE. El resultado es un mapa proteico con alta resolución donde una banda generalmente contiene una única proteína [1]. La electroforesis 2D generalmente se aplica para acceder al inventario total de proteínas de las células vivas. La electroforesis 2D se complementó más tarde con genómica para el análisis de los genomas relativamente estáticos como modelo de vida y transcriptómica para acceder al inventario de ARNm altamente dinámico necesario para una mayor producción de proteínas. Aunque el nombre de electroforesis 2D sugiere que es un proceso de dos pasos, de hecho es un proceso de cinco pasos:

1. Extracción de proteínas de la muestra biológica
2. Primera separación añadiendo la proteína en un

gradiente de pH para separarlas respecto a su punto isoeléctrico

3. Interfaz con la segunda separación con adición de buffer conteniendo SDS para cargar negativamente las proteínas
4. Segunda separación en un gel SDS PAGE para separar las proteínas respecto a su masa molecular
5. Detección de proteínas en el gel

Generalmente, el orden de la separación es primero por punto isoeléctrico y después por electroforesis SDS, aunque también puede ser en el orden contrario. La figura 2 resume los pasos básicos para llevar a cabo una electroforesis en dos dimensiones [7].

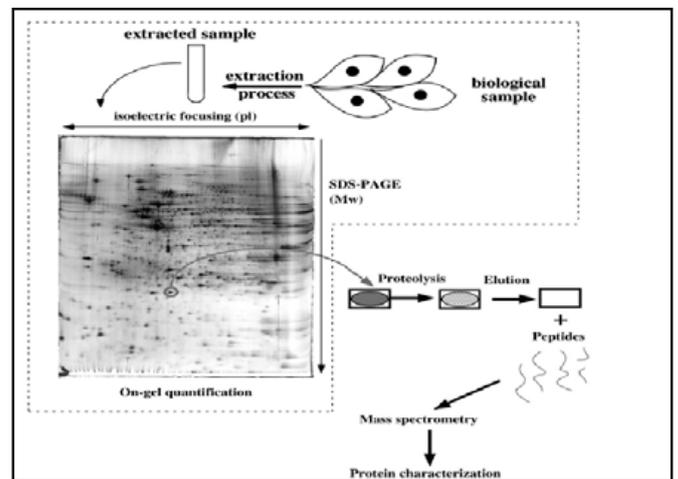


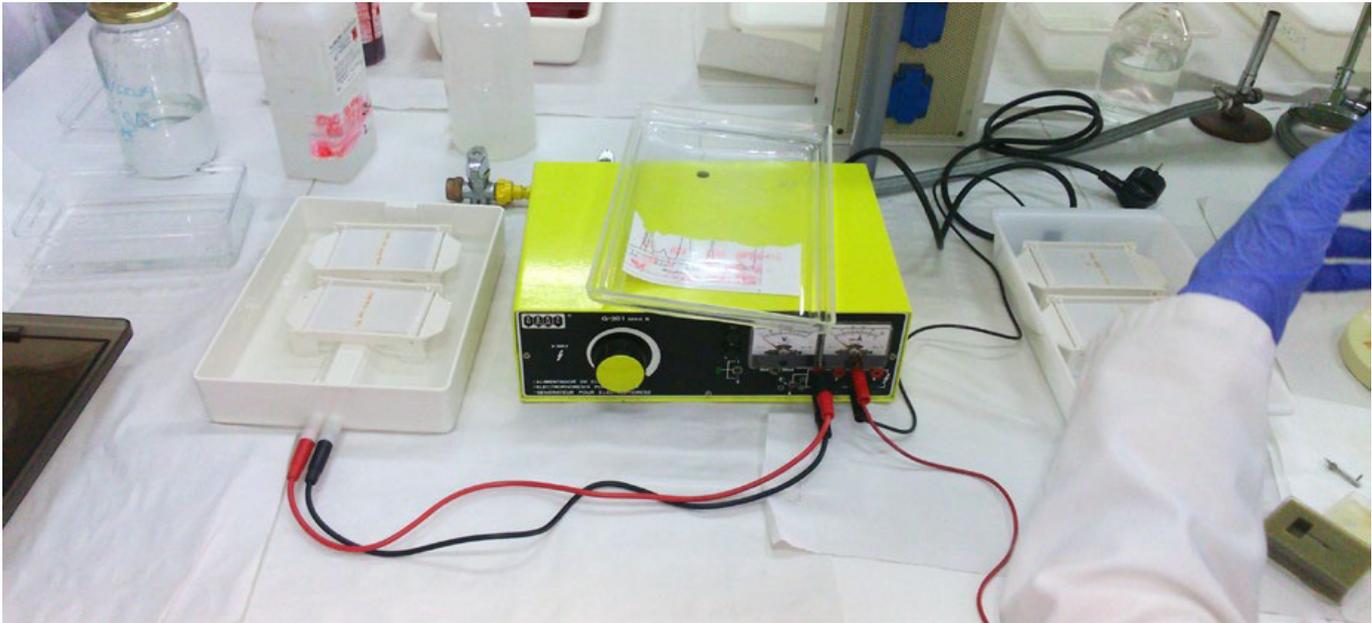
Figura 5. Esquema sobre la metodología general de Electroforesis 2D

Aplicaciones. A pesar de las limitaciones que presenta la electroforesis en 2D hacia proteínas de membrana, esta técnica sigue siendo ampliamente utilizada en proteómica debido a la economía del proceso y a que los procesos de análisis de las proteínas en el gel por espectroscopia de masas son simples y baratos. Sin embargo, la razón principal de la popularidad de esta técnica se encuentra en su reproducibilidad y su robustez así como en la facilidad de sus análisis cuantitativos [5].

Las aplicaciones de la técnica de electroforesis en 2D son amplias. Se ha utilizado esta técnica en proteómica bacteriana donde la cantidad de muestras es limitada o en estudios de toxicología donde se tiene un gran número de muestras. También en micro-enzimología donde se utiliza como una herramienta micropreparativa de proteínas, en inmunoproteómica donde la respuesta inmune de pacientes es evaluada a nivel proteómico y en el estudio de modificaciones post-traduccionales [5].

CONCLUSIONES

Las técnicas de electroforesis han revolucionado los métodos de análisis de biomoléculas y la caracterización de microorganismos en diferentes campos de las ciencias biológicas como las ciencias ómicas (genómica,



transcriptómica, proteómica, metagenómica) ya que estas técnicas se han combinado con otras plataformas como PCR, técnicas de secuenciación de nueva generación y espectroscopía de masas acoplada a cromatografía de líquidos, entre otras lo cual ha permitido una mejor resolución y precisión de resultados experimentales. Sin embargo, las limitaciones asociadas a esta técnica deben solucionarse para poder aproximarnos a un mejor entendimiento de la composición, funcionamiento y cambios en el tiempo de los sistemas biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kucharska, E., & Wróblewska, B. Food allergens. In *Toxins and Other Harmful Compounds in Foods*, 2017
- [2] Brunelle, J. L., & Green, R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 541), 2014
- [3] Lee, M. K., Kim, J. K., & Lee, S. Y. Effects of fermentation on SDS-PAGE patterns, total peptide, isoflavone contents and antioxidant activity of freeze-thawed tofu fermented with *Bacillus subtilis*. *Food Chemistry*, 249(July 2017), 60–65, 2018
- [4] Muharram, M. M., & Abdel-Kader, M. S. Utilization of gel electrophoreses for the quantitative estimation of digestive enzyme papain. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 359–364, 2017
- [5] Rabilloud, T., & Lelong, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*, 74(10), 1829–1841, 2011
- [6] Righetti, P. G. ELECTROPHORESIS | Polyacrylamide Gels. In *Encyclopedia of Analytical Science* (3rd ed.), 2005a
- [7] Righetti, P. G. ELECTROPHORESIS | Two-Dimensional Gels. In *Encyclopedia of Analytical Science* (3rd ed.), 2005b
- [8] Stellwagen, N. C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*, 30(SUPPL. 1), 188–195, 2009
- [9] Strathdee, F., & Free, A. (n.d.). Chapter 9 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). 1054, 145–157, 2013
- [10] Subasinghe, R. M., Samarajeewa, A. D., Scroggins, R., & Beaudette, L. A. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and next generation sequencing (

NGS) in combination with enrichment culture techniques to identify bacteria in commercial microbial-based products. *Journal of Microbiological Methods*, 161(April), 118–130, 2019

- [11] Zhang, X., Sun, Z., & Yang, Q. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis to the Analysis of Bacterial Communities Associated With Asymptomatic and Symptomatic Pericoronitis. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 76(3), 483–489, 2017
- [12] Azqueta, A., and Collins, A. R. "The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair," *Archives of toxicology*, vol. 87, no. 6, pp. 949-968, 2013.
- [13] Lopez-Canovas, L., Benitez, M. B. M., Isidron, J. A. H., & Soto, E. F. "Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future," *Analytical biochemistry*, submitted for publication, 2019.
- [14] Pulpipat, T., Lin, K. H., Chen, Y. H., Wang, P. C., & Chen, S. C. "Molecular characterization and pathogenicity of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from cultured tilapia (*Oreochromis sp.*) in Taiwan," *Journal of fish diseases*, vol. 42, pp. 643-655, 2019.
- [15] Upcroft, P., & Upcroft, J. A. "Comparison of properties of agarose for electrophoresis of DNA," *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 618 no. (1-2), pp. 79-93, 1993.

