



Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

**CURSO DE POSGRADO Y DOCTORADO
“TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES”
PROGRAMA TEÓRICO Y PRÁCTICO**

TEORÍA

Electroforesis. Factores involucrados: eléctricos, físicos, químicos. Control de condiciones eléctricas. Efecto de la atmósfera iónica (Debye). Electroforesis libre y en medio soporte. Efectos de adsorción, tamiz molecular y electroendósmosis. Fuerza electroendosmótica (FEO): formación de la doble capa eléctrica. Tinciones generales y diferenciales. Densitometría.

Electroforesis en gel de agarosa. Equipos. Agarosa: características. Factores que afectan la movilidad de ácidos nucleicos. Control de integridad de ARN y análisis de perfiles electroforéticos de fragmentos de DNA. Electroforesis de campo pulsante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Polimerización de monómeros. Movimiento de las moléculas a través de los poros del gel. Condiciones nativas y desnaturalizantes. Sistemas homogéneos y discontinuos. Sistema multifásico de buffers. Función reguladora de Kohlrausch. Determinación de tamaños moleculares: diagrama de Ferguson y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Detección después de la electroforesis. Western blotting. Distintas técnicas de transferencia, Tipos de membranas. Inmunodetección. Detección de interacción de proteína-ADN (EMSA).

Isoelectroenfoque (IEF). Fundamento teórico. Principios fisicoquímicos. Gradientes de pH naturales e inmovilizados. Determinación de punto isoeléctrico de compuestos anfotéricos. Curvas de titulación de proteínas. Electroforesis 2D (IEF + SDS-PAGE).

Electroforesis capilar. Fundamento de la técnica, principios fisicoquímicos. Fuerza electroendosmótica, dispersión, movilidad, tiempo de migración. Tipos de capilares. Diferentes modos de operación. Determinación de tamaños moleculares, puntos isoeléctricos, interacción de proteína-ADN (cEMSA). Aplicaciones de la técnica de electroforesis capilar a análisis e investigaciones clínicas, bioquímicas, farmacéuticas e industriales.

TRABAJOS PRÁCTICOS

- Electroforesis. Efecto de la variación en los parámetros eléctricos y químicos sobre desarrollos electroforéticos. Control de los parámetros usados. Necesidad del uso de soluciones reguladoras.
- Electroforesis en gel de agarosa. Determinación de integridad de ARN y análisis de fragmentos de ADN. Efecto del tamaño de poro, la fuerza electroendosmótica de la agarosa, el uso de distintas cubas y peines, el cambio de buffers, las condiciones eléctricas y los tiempos de electroforesis sobre los resultados del desarrollo electroforético.
- Electroforesis en gel de poliacrilamida. Efecto de la variación en los parámetros eléctricos sobre el desarrollo electroforético. Desarrollos en condiciones nativas y desnaturalizantes. SDS-PAGE. Tamaños moleculares. Sistemas discontinuos de proteínas ácidas o neutras empleando el sistema multifásico de buffers, bajo distintas condiciones experimentales. Modificaciones en el protocolo



Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

para efectuar el análisis de proteínas básicas. Comparación de eficiencia, sensibilidad y tiempos de tinción y desteñido entre las tinciones generales y especiales. Aplicación a un modelo de EMSA.

- Semicuantificación y análisis de resultados obtenidos en geles utilizando el *software* ImageJ. Resolución de muestras problema. Limitaciones de la técnica. Ejemplos.
- *Western blotting*. Transferencias húmeda y semiseca. Comparación de ventajas y desventajas entre ambas técnicas. Detección colorimétrica, por quimioluminiscencia (ECL) y por fluorescencia. Control de la eficiencia del procedimiento.
- Electroforesis Capilar de Zona (CZE): descripción del equipo. Influencia que tiene la modificación de parámetros (campo eléctrico, temperatura y pH del buffer) sobre la velocidad del flujo electroosmótico. Detectores. Identificación y cuantificación de analitos. Formas de representación e interpretación de electroferogramas.
- Isoelectroenfoque Capilar (CIEF). Determinación de puntos isoelectrónicos de compuestos anfotéricos. Necesidad del uso de distintos tipos de capilares. Estandarización de los resultados.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y PROBLEMAS

Presentación de resultados por los participantes al curso. Discusión, aplicando conceptos teóricos y prácticos. Resolución de problemas basados en situaciones frecuentes que surgen durante el desarrollo de las técnicas electroforéticas. Cálculo de parámetros derivados del análisis de resultados (tamaños moleculares, puntos isoelectrónicos, constantes fisicoquímicas).

EVALUACIÓN

- ✓ Participación en clases teóricas y prácticas
- ✓ Informe con el análisis de los resultados de los trabajos prácticos
- ✓ Examen final

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews AT. *Electrophoresis. Theory, techniques and Biochemical and Clinical Applications*. Oxford: Clarendon Press, 1992, Gran Bretaña.
- Atkins PW. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, Nueva York, 2006, USA.
- García-Segura JM et al. *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica*. Editorial Síntesis, 2008, Madrid, España.
- Hames BD (ed.). *Gel electrophoresis of proteins. A practical Approach*. Oxford University Press Inc, 1998, Nueva York, USA:
- Skoog DA, Holler J, Crouch S. *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw-Hill, Madrid, 2009, España.
- Wilson K & Walker J (ed.). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge University Press, Cambridge, 2000, Gran Bretaña.
- Artículos sobre distintos tópicos de "Electroforesis".

Dra. DANIELA C. VITTORI
F.C.E.N. - UBA
CONICET