


QBA 2019
3



CURSO DE POSGRADO Y DOCTORADO
"TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES"
PROGRAMA TEÓRICO Y PRÁCTICO - 2019

Este curso, en la modalidad de postgrado y doctorado, surgió debido a la gran versatilidad de las técnicas electroforéticas, a su enorme utilidad en el estudio de muestras biológicas y al desarrollo técnico constante, conocimientos que, en general, no están incorporados en profundidad en los planes de estudios de Carreras relacionadas con la Química Biológica.

La necesidad de un curso sobre técnicas electroforéticas eminentemente práctico apoyado en imprescindibles conceptos teóricos queda demostrada, a lo largo de los años desde la creación de este curso, por la numerosa participación de profesionales provenientes de distintos ámbitos del conocimiento, tales como química, biología, veterinaria, bioquímica, medicina, agronomía, biotecnología e ingeniería, egresados de universidades nacionales y extranjeras.

1. TEORÍA

Electroforesis

Fundamento. Procesos fisicoquímicos: Factores involucrados: eléctricos, físicos, químicos. Tablas de movilidad electroforética de iones inorgánicos y de proteínas. Electroforesis a bajo y alto voltaje. Sistemas de refrigeración. Desarrollos electroforéticos a voltaje, intensidad o potencia constante. Control de condiciones eléctricas. Soluciones reguladoras (pH, fuerza iónica). 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 (capas de Stern y de Helmholtz), dependencia del pH, del campo eléctrico y de las características del medio. Métodos de detección y cuantificación después de electroforesis. Tinciones generales y diferenciales. Densitometría: cuantificación por densidad de color (espectrometría, uso de software): limitaciones de su aplicación.

Electroforesis en gel de agarosa

Condiciones. Equipos. Características de los distintos tipos de agarosa comercial. Selección del tipo de agarosa a utilizar para distintas aplicaciones. Factores que afectan la movilidad de ácidos nucleicos. La electroforesis en la técnica de PCR (concepto de la técnica, detalles de los desarrollos electroforéticos). Aplicaciones para el control de integridad de ADN. Análisis de perfiles electroforéticos de fragmentos de DNA obtenidos por PCR. Electroforesis en la detección de procesos de apoptosis: técnicas de ladder y cometa. Electroforesis de campo pulsante: equipos, características técnicas, aplicaciones.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Características de la polimerización, identificación de las condiciones óptimas para la preparación del gel. Catalizadores. Tamaño de poro. Geles con gradiente de poro. Teorías acerca del movimiento de las moléculas a través de los poros del gel. PAGE en condiciones nativas y desnaturalizantes. Técnicas analítica y preparativa. Sistemas homogéneos y discontinuos. Sistema multifásico de buffers. Electroforesis de límite móvil, principio de isotacoforesis en el gel concentrador. Función reguladora de Kohlrausch, su participación en la concentración de proteínas en el gel. Determinación de tamaños moleculares: diagrama de Ferguson y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Teoría de la acción del SDS sobre distintos tipos de proteínas. Limitaciones de su aplicación. Técnicas de detección después de la electroforesis.

Electrotransferencia a membranas. Controles. Distintas técnicas de transferencia y de revelado.

Zimografía: adición de sustratos degradables (gelatina, fibrina). Condiciones óptimas de trabajo. Análisis de enzimas proteolíticas.

Densitometría: principios del uso del software ImageJ. Limitaciones en la aplicación.

Isoelectroenfoque (IEF)

Fundamento teórico. Principios fisicoquímicos. Desarrollo: medio libre y medios soporte (geles de poliacrilamida y de agarosa). Formación y determinación del gradiente de pH. Preparación de gradientes naturales e inmovilizados. Criterios para la selección de anfólitos y de inmovilinas.

Equipos. Fuentes de poder. Condiciones eléctricas. Cálculo y utilidad del parámetro Voltxhora. Determinación de punto isoeléctrico. Utilidad de la obtención de curvas de titulación de proteínas en un sistema de isoelectroenfoco.

Electroforesis bidimensional

Uso de una o dos técnicas electroforéticas en dos dimensiones para ampliar el poder resolutivo. Combinación de técnicas de electroforesis convencional y de IEF en distintos soportes. Combinaciones de IEF y PAGE (2D). Interpretación de resultados. Equipos. Programas informáticos. Aplicación en Proteómica.

Electroforesis y detección inmunológica.

Combinación de desarrollo electroforético y reacción inmunológica. Fundamento. Descripción de las diferentes técnicas: Inmunofijación, inmunolectroforesis, electroinmunodifusión monodimensional (rocket), electroinmunodifusión cruzada. Contrainmunolectroforesis. Características de las técnicas: sensibilidad, especificidad. Aplicación al estudio de modificaciones estructurales de proteínas y a análisis epidemiológicos.

Western blotting: característica de la técnica, métodos de detección colorimétrico, quimioluminiscencia y por fluorescencia. Aplicación de softwares al análisis semicuantitativo de densidad de bandas.

Electroforesis capilar

Fundamento de la técnica, principios fisicoquímicos. Fuerza electroosmótica, dispersión, movilidad, tiempo de migración. Modos de operación: electroforesis capilar de zona (CZE), cromatografía miscelar electrocinética (MEKC), isoelectroenfoco (CIEF), isotacoforesis (CIP), electrocromatografía. Separación de compuestos quirales. Equipos. Tipos de capilares. Detectores (UV, arreglo de diodos, fluorescencia).

Electroforesis en gel de poliacrilamida. Condiciones del capilar, forma de preparar el relleno, uso de agentes desnaturizantes. SDS-cPAGE para determinación de tamaños moleculares.

Interacción de proteínas-ADN por ensayos de modificación de la movilidad (eEMSA, capillary electrophoretic mobility shift-assay). Determinación de constantes de equilibrio.

Aplicaciones de la técnica de electroforesis capilar a análisis e investigaciones clínicas, bioquímicas, industriales y en control de calidad.

2. TRABAJOS PRACTICOS

Objetivo: En general, los participantes del curso ya han tenido alguna experiencia en la utilización de la técnica de electroforesis, en particular, PAGE y/o electroforesis en agarosa. En los trabajos prácticos de este curso podrán utilizar las técnicas para verificar los conceptos teóricos que se imparten. Para ello, no se trata de obtener el mejor resultado posible sino de realizar modificaciones en los tiempos y condiciones de cada técnica para que puedan observarse los resultados descritos en la teoría. Por otra parte, también las muestras son elegidas de tal manera que permita determinar cuál es la técnica más apropiada para el análisis según las características del análisis a realizar, evaluando, en cada caso, el fundamento aplicado. A partir del desarrollo de los trabajos prácticos, se podrán responder las siguientes preguntas:

- Electroforesis a bajo voltaje. ¿Cómo afecta a un desarrollo electroforético la variación en los parámetros eléctricos y químicos? ¿En toda electroforesis es imprescindible el uso de soluciones reguladoras? ¿Cómo se determinan las condiciones eléctricas cuando se trabaja con sistemas en serie? Conocimiento del uso de tester. Control de los parámetros usados.
- Electroforesis en gel de agarosa. Determinación de integridad de ARN. Análisis de fragmentos de ADN obtenidos por PCR. ¿Cómo afecta al desarrollo electroforético la variación en el tamaño de poro y de la fuerza electroosmótica de la agarosa, el uso de distintos cubas y peines de diferente tamaño, el cambio de buffers, de condiciones eléctricas y de tiempos de electroforesis? Aplicación en estudios genéticos.

- Electroforesis en gel de poliacrilamida. ¿Cómo afecta al desarrollo electroforético la variación en los parámetros eléctricos? Condiciones nativas y desnaturizantes. SDS-PAGE. Tamaños moleculares. Sistemas discontinuos. ¿Cómo demostrar el efecto que ocurre en el gel concentrador del sistema multifásico de buffers? ¿Se puede reemplazar la glicina del protocolo de Laemmli por otro aminoácido? ¿Qué efecto se observaría? ¿Cómo se modifica el protocolo para realizar el análisis de proteínas básicas? Análisis de proteínas neutras y ácidas y de proteínas básicas aplicando el sistema multifásico de buffers, bajo distintas condiciones experimentales (tiempo, tamaño de poro, tamaño de gel concentrador, condiciones eléctricas, volúmenes de siembra y dispositivos de trabajo). Sistemas de PAGE con urea: análisis de agregados proteicos. Placas con gradiente de poro. Tinciones especiales: tinciones de plata, con violeta de genciana, de Coomassie, tinción diferencial de plata+Coomassie, tinciones para glicoproteínas y para lipoproteínas. Comparar eficiencia, sensibilidad y tiempos de tinción y destañido. Ensayo de zimografía.
- Semicuantificación y análisis de resultados obtenidos en geles utilizando el *software* ImageJ. Resolución de muestras problema. Ejemplos de muestras que revelen las limitaciones de la técnica.
- *Western blotting*. Transferencias húmeda y semiseca. Comparar ventajas y desventajas de ambas técnicas. Detección colorimétrica, por quimioluminiscencia (ECL) y por fluorescencia. Evaluación de la sensibilidad de los métodos de detección usados. Evaluación de distintos tiempos de transferencia para determinar el tiempo efectivo. ¿Cómo se controla la eficiencia del procedimiento?
- Desarrollo de electroinmunodifusión cruzada sobre placas de Titán. Identificación de modificaciones estructurales en una proteína. Comparación con la proteína nativa.
- Electroforesis capilar.
 Electroforesis Capilar de Zona (CZE): influencia que tiene la modificación de parámetros (campo eléctrico, temperatura y pH del buffer) sobre la velocidad del flujo electroendosmótico. ¿Cómo es afectada la resolución de la separación de una muestra proteica cuando se modifica la velocidad de inyección? Detección. Cuantificación de analitos. Formas de representación e interpretación de electroferogramas.
 Isoelectroenfoque Capilar (CIEF). Determinación de puntos isoeléctricos de proteínas. ¿Cómo se estandarizan los resultados? Necesidad del uso de distintos tipos de capilares. Condiciones de mantenimiento y resguardo de los capilares.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Presentación de resultados por comisiones. Discusión, aplicando conceptos teóricos y prácticos.

4. PROBLEMAS

Resolución de problemas basados en situaciones frecuentes que surgen durante el desarrollo de las técnicas electroforéticas. Planteo de cálculo de parámetros involucrados en las distintas técnicas electroforéticas o derivados del análisis de resultados (tamaños moleculares, puntos isoeléctricos, constantes fisicoquímicas).

EVALUACIÓN

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

Handwritten signature



BIBLIOGRAFIA

La bibliografía que se encuentra en el laboratorio es recomendada para consulta y ampliación de conocimientos por parte de los alumnos. Se les proporciona de acuerdo al interés en algún tema específico.

Libros:

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:

Heiger DN. *High Performance Capillary Electrophoresis*. Editado por Hewlett-Packard Company, 1992, Alemania.

Skoog DA, Holler J, Crouch S. *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw-Hill, Madrid, 2009, España.

Westermeyer R. *Electrophoresis in Practice*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Freiburg, Alemania.

Wilson K & Walker J (ed.). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Cambridge University Press, Cambridge, 2000, Gran Bretaña.

Artículos sobre distintos tópicos de "Electroforesis". Algunos ejemplos:

Alvarez RDA et al. *Effects of a polar amino acid substitution on helix formation and aggregate size along the detergent-induced peptide folding pathway*. *Biochim Biophys Acta* 1828:373-381, 2013.

Bech-Serra et al. *A Multi-Laboratory Study Assessing Reproducibility of a 2D-DIGE Differential Proteomic Experiment*. *J Biomol Tech*, 20:293-6, 2009.

Frankowski H et al. *Use of Gel Zymography to Examine Matrix Metalloproteinase (Gelatinase) Expression in Brain Tissue or in Primary Glial Cultures*. *Methods Mol Biol* 814: 221-33, 2012.

Lucy C et al. *Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis*. *J Chromatog A*, 1184:81-105, 2008.

Ratha A, et al. *Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins*. *Proc Natl Acad Sci* 106:1760-65, 2009.

Renthal R. *An unfolding story of Helical Transmembrane Proteins*. *Biochemistry* 45: 14559-66, 2006.

Steiner F et al. *Control of electroosmotic flow in nonaqueous capillary electrophoresis by polymer capillary coatings*. *Electrophoresis* 24:399-407, 2003.

Stroylova YY et al. *Aggregation and structural changes of α S1-, β - and κ -caseins induced by homocysteinylation*. *Biochim Biophys Acta*, 1814:1234-45, 2011.

Park SH, et al. *Capillary electrophoretic mobility shift assay for binding of DNA with NFAT3, a transcription factor from H9c2 cardiac myoblast cells*. *Electrophoresis* 32:2174-80, 2011.

Bao J et al. *Prediction of Protein-DNA complex mobility in gel-free capillary electrophoresis*. *Anal Chem* 87:2474-9, 2015.

Alu

Alu

Alu



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Ref. Expte. N° 3069/2019

Ciudad Autónoma de Buenos Aires,

22 ABR 2019

VISTO

La nota a foja 60 presentada por la Dirección del Departamento de Química Biológica, mediante la cual eleva la información del curso de posgrado **Técnicas Electroforéticas: Fundamentos y Aplicaciones** para el año 2019,

CONSIDERANDO

- Lo actuado por la Comisión de Doctorado,
- Lo actuado por la Comisión de Posgrado,
- Lo actuado por la Comisión de Presupuesto y Administración,
- Lo actuado por este Cuerpo en la sesión realizada en el día de la fecha,
- En uso de las atribuciones que le confiere el Artículo 113° del Estatuto Universitario,

**EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
RESUELVE:**

ARTÍCULO 1°: Aprobar el curso de posgrado **Técnicas Electroforéticas: Fundamentos y Aplicaciones** de 70 horas de duración, que será dictado por las Dras. Alcira Nesse y Daniela Vittori.

ARTÍCULO 2°: Aprobar el programa del curso de posgrado **Técnicas Electroforéticas: Fundamentos y Aplicaciones** obrante a fs. 65/68, para su dictado del 5 al 16 de agosto 2019.

ARTÍCULO 3°: Aprobar un puntaje máximo de tres (3) puntos para la Carrera del Doctorado.

ARTÍCULO 4°: Aprobar un arancel de 1800 módulos. Disponer que los fondos recaudados ingresen en la cuenta presupuestaria habilitada para tal fin, y sean utilizados de acuerdo a la Resolución 072/03.

ARTÍCULO 5°: Disponer que de no mediar modificaciones en el programa, la carga horaria y el arancel, el presente Curso de Posgrado tendrá una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la presente Resolución.

ARTÍCULO 6°: Comuníquese a todos los Departamentos Docentes, a la Dirección de Estudiantes y Graduados, a la Dirección de Movimiento de Fondos, a la Dirección de Presupuesto y Contabilidad, a la Biblioteca de la FCEyN y a la Secretaría de Posgrado con copia del programa incluida. Cumplido, archívese.

0893

RESOLUCIÓN CD N° _____

SP-GA- 05-04-2019

Dr. BERNARDO GABRIEL MINDLIN
SECRETARIO DE POSGRADO
FCEN - UBA

Dr. JUAN CARLOS REBOREDA
DECANO

0893