

Q. B. 2004
2 (13) (4)
3
COMITÉ DE CALIFICACIONES EN CIENCIAS FÍSICO-QUÍMICAS

**PROGRAMA 2004 - CURSO DE POSTGRADO
TECNICAS ELECTROFORETICAS. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES**

Electroforesis

Teoría general. Movilidad electroforética. Factores que influyen en procesos electroforéticos: eléctricos, físicos, químicos. Características fisicoquímicas de la electroforesis. Electroforesis a bajo y alto voltaje. Control de condiciones eléctricas. Soluciones reguladoras (pH, fuerza iónica). Medios soporte. Métodos de detección y cuantificación. Tinciones generales y diferenciales. Cuantificación por densidad de color. Densitómetro.

Electroforesis en geles de agarosa

Condiciones. Equipos. Factores que afectan la movilidad. Detección de ácidos nucleicos. Estudio semicuantitativo de niveles de ARNm mediante programas de análisis densitométrico. Aplicaciones para el control de integridad de ADN. Análisis de fragmentos de cDNA obtenidos por PCR. Aplicación a procesos de apoptosis (ladder).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Características de la polimerización, condiciones óptimas de preparación del gel. Catalizadores. Tamaño de poro. Teorías acerca del movimiento de las moléculas a través del gel. PAGE en condiciones nativas y desnaturalizantes. Electroforesis preparativa. Gradientes de poliacrilamida. Sistemas homogéneos y de buffers discontinuos. Determinación de pesos moleculares: diagrama de Ferguson y PAGE en presencia de SDS. Técnicas de detección. Western blot: métodos de detección colorimétrico y por quimioluminiscencia. Utilización de programas informáticos para análisis semicuantitativo de densidad de bandas.

Isoelectroenfoque (IEF)

Teoría general. Principios fisicoquímicos. Medios soporte: geles de poliacrilamida y de agarosa. Anfolitos. Formación y determinación del gradiente de pH. Gradientes naturales e inmovilizados. Equipos. Fuentes de poder. Condiciones eléctricas. Cálculo de Volthora. Sistemas de refrigeración. Curvas de titulación de proteínas.

Electroforesis bidimensional

Combinaciones de IEF y PAGE. Interpretación de resultados. Equipos. Programas informáticos. Aplicaciones.

Electroforesis y detección inmunológica.

Combinación del desarrollo electroforético y reacción inmunológica. Fundamento. Inmunofijación, inmunolectroforesis, electroinmunodifusión monodimensional (rocket), electroinmunodifusión cruzada. Contrainmunolectroforesis. Características de las técnicas (sensibilidad, especificidad). Aplicación.

Electroforesis capilar

Fundamento, principios. Fuerza electroosmótica, dispersión, movilidad, tiempo de migración. Modos de operación: de zona (CZE), cromatografía miscelar electrocinética (MEKC), isoelectroenfoque (CIEF), isotacoforesis (CIP). Equipos. Capilares. Detectores. Aplicaciones. Separación de compuestos quirales.

Cuy



TRABAJOS PRACTICOS

- 1) *Condiciones eléctricas en el desarrollo electroforético. Medición de voltaje e intensidad. Medios soporte: membranas de acetato de celulosa, geles de agar y agarosa. Tinciones generales y diferenciales.*
- 2) *Electroforesis en geles de agarosa. Determinación de integridad de ADN y ARN. Identificación de fragmentos de ADNc amplificados por PCR, de acuerdo con su movilidad electroforética en gel de agarosa usando marcadores de tamaño molecular.*
- 3) *Preparación del sistema de PAGE en placa (armado y sellado). Electroforesis en geles de poliacrilamida. Sistemas de buffers homogéneo y discontinuo. Condiciones nativas y desnaturalizantes. Tratamiento de la muestra. Siembra. Tinciones. Secado de gel. Determinación de masas moleculares de macromoléculas.*
- 4) *Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida. Elección de parámetros eléctricos. Preparación de placas. Desarrollo. Tinción. Cálculo de los volt-horas. Medición del gradiente de pH.*
- 5) *Combinación de técnicas electroforéticas e inmunológicas para la detección, cuantificación y/o caracterización de proteínas: comparación de las técnicas de electroinmunodifusión (rocket) e inmunofijación sobre membranas de acetato de celulosa. Western blot.*
- 6) *Electroforesis capilar. Determinación de condiciones de trabajo. Comparación de distintos modos de operación.*

Teóricas, seminarios, discusión de problemas y análisis de resultados: 40%.

Trabajos prácticos individuales: 50%.

Trabajos prácticos grupales: 10%.

BIBLIOGRAFIA

- Bibliografía específica en revistas científicas de publicación periódica: artículos de actualización seleccionados.
- Bibliografía general:

Andrews AT. *Electrophoresis. Theory, techniques and Biochemical and Clinical Applications.* Oxford University Press, Nueva York, USA.

Campbell AM. *Monoclonal Antibody technology,* Elsevier, Amsterdam, Holanda.

Curtius H & Roth M. *Clinical Biochemistry. Principles and methods.* Walter de Gruyter, Nueva York, USA.

García-Segura JM et al. *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica.* Editorial Síntesis, Madrid, España.

Hames BD & Rickwood D (editores). *Gel electrophoresis of proteins. A practical Approach.* Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.

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

Hudson L & Hay F. *Practical Immunology.* Blackwell Scientific Publications, Londres, Inglaterra.

Skoog DA & Leary JJ. *Análisis Instrumental.* McGraw-Hill, Madrid, España.

Alu