

**TECNICAS ELECTROFORETICAS. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES**  
**CURSO DE POSTGRADO - PROGRAMA 2006**

**Características del curso:**

*Enfocado a profundizar los conceptos sobre la metodología electroforética que se hubieran adquirido en materias básicas de las respectivas carreras y a aportarles a los alumnos herramientas para su capacitación en técnicas electroforéticas. Con respecto a las materias básicas de las licenciaturas que se dictan en esta Facultad, el curso amplía los fundamentos teóricos y los aspectos experimentales de algunas técnicas, incorpora la enseñanza de nueva metodología y permite a los graduados un contacto directo con la problemática que surge en la aplicación de estas técnicas, así como la discusión teórica aplicada a la resolución de tales problemas.*

**Temas a desarrollar en el curso:**

**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. Densitometría.*

**Electroforesis en geles de agarosa**

*Medio soporte: características de los distintos tipos de agarosa. Condiciones para su elección. Equipos: cubas horizontales, electroforesis submarina. Factores que afectan la movilidad electroforética en este medio soporte. Análisis de ácidos nucleicos. Uso de electroforesis en la técnica de PCR (concepto y generalidades de la técnica, detalles de los desarrollos electroforéticos). Aplicaciones para el control de integridad de ADN. Análisis de fragmentos de cDNA obtenidos por PCR. Electroforesis en soporte de agarosa en el análisis de procesos de apoptosis (técnicas de ladder y cometa).*

**Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)**

*Características de la polimerización, condiciones óptimas de preparación del gel. Catalizadores. Tamaño de poro. Gradientes de poliacrilamida. Teorías acerca del movimiento de las moléculas a través del gel. PAGE en condiciones nativas y desnaturalizantes. Técnicas analítica y preparativa. Sistemas homogéneos y de buffers discontinuos. Determinación de pesos moleculares: diagrama de Ferguson y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Técnicas de detección. Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Controles. Distintas técnicas de revelado.*

**Isoelectroenfoque (IEF)**

*Teoría general. Principios fisicoquímicos. Medios soporte: geles de poliacrilamida y de agarosa. Anfólitos. 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: proteómica.*

**Electroforesis de campo pulsante**

*Fundamentos. Equipos. Características técnicas. Aplicaciones.*

**Electroforesis y detección inmunológica.**

Combinación del desarrollo electroforético y reacción inmunológica. Fundamento. Descripción de las diferentes técnicas. Inmunofijación, inmunolectroforesis, electroinmunoprecipitación monodimensional (rocket), electroinmunoprecipitación cruzada. Contraelectroforesis. Características de las técnicas (sensibilidad, especificidad). Aplicación. Western blot: métodos de detección colorimétrico y por quimioluminiscencia. Aplicación de software al análisis semicuantitativo de densidad de bandas.

#### **Electroforesis capilar**

Fundamento, principios. Aspectos teóricos y experimentales. Fuerza electroosmótica y flujo electroosmótico reverso. Dispersión, movilidad, tiempo de migración. Equipos. Capilares. Detectores. Análisis cuantitativo. Modos de operación: de zona (CZE), cromatografía miscelar electrocinética (MEKC), isoelectroenfoque (CIET), isotacoforesis (CIP). Separación de compuestos quirales. Comparación de modos de operación. Aplicaciones.

### **TRABAJOS PRACTICOS**

**Objetivo:** Los trabajos prácticos, que constituyen 60% del curso, están enfocados: a) al conocimiento de distintos equipos electroforéticos y la adquisición de habilidad en el uso de los mismos mediante la realización de prácticas personales; b) a la aplicación de diferentes técnicas para resolver de problemas de uso frecuente (ej.: electroforesis en gel de poliacrilamida en el control de calidad en Bromatología, isoelectroenfoque en el control de calidad en Farmacología, electroforesis en gel de agarosa en análisis genéticos, combinación de técnicas electroforéticas e inmunológicas en la identificación de proteínas, electroforesis capilar en la separación de compuestos de bajo peso molecular).

- 1) Condiciones eléctricas en el desarrollo electroforético. Medición de voltaje e intensidad. Poder resolutivo de medios soporte: membranas de acetato de celulosa, geles de agar, agarosa y poliacrilamida. Evaluación del flujo electroosmótico. 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. Análisis de apoptosis celular por ladder.
- 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 y características estructurales de macromoléculas.
- 3) Isoelectroenfoque. Elección de parámetros eléctricos, medio soporte y electrolitos. Preparación de placas. Desarrollo. Tinción. Cálculo de volthoras. Formación y medición de gradientes de pH.
- 4) 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 gelificado y Titán. Transferencia eléctrica a membranas de nitrocelulosa. Western blot. Distintas técnicas de revelado.

*Qui*

5) *Electroforesis capilar. Identificación de los factores que intervienen en electroforesis capilar. Aspectos operativos. Variación de las condiciones de trabajo (eléctricas, características del capilar, inyección, tamaño de muestra, propiedades de los compuestos a separar, modos de operación, detección). Resolución de problemas relacionados con el análisis cuantitativo. Aplicación de la detección indirecta en UV para la separación de cationes inorgánicos.*

#### **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.

Work TS, Work E. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* Vol IV. American Elsevier Publ. Co., New York, USA.

  
Dra. Alcira Nesse