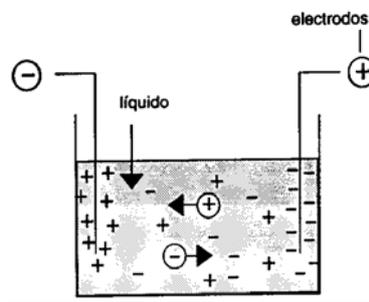
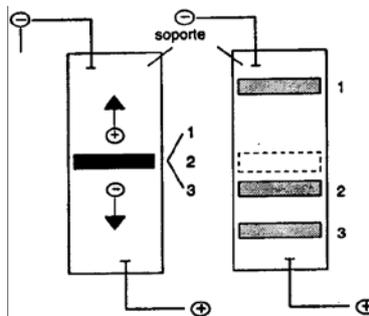


Introducción

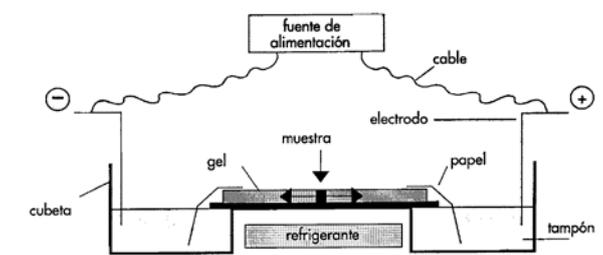
- ⇒ Técnica analítica separativa: Transporte de moléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico
- ⇒ Movilidad electroforética “ μ ” depende de:
 - ⇒ La carga de la molécula
 - ⇒ Depende del medio
 - ⇒ pH
 - ⇒ Fuerza iónica
 - ⇒ El tamaño de la molécula, incluyendo esfera de solvatación
 - ⇒ La forma de la molécula
- ⇒ Tipos de electroforesis
 - ⇒ Electroforesis libre
 - ⇒ Campos aplicados sobre una disolución o suspensión
 - ⇒ Poca resolución. Poca utilidad



- ⇒ Electroforesis zonal
 - ⇒ Campo aplicado a un soporte estabilizante
 - ⇒ Muestra dispuesta sobre una zona reducida del soporte



- ⇒ Material necesario
- ⇒ La muestra, dispuesta en una pequeña zona del soporte lo recorre impulsada por el campo eléctrico
- ⇒ Efectos perjudiciales
 - ⇒ Difusión
 - ⇒ Calentamiento (efecto Joule)
 - ⇒ Corrientes de convección



Factores que Afectan a la Electroforesis

- ⇒ Campo eléctrico. Depende de:
 - ⇒ Potencial eléctrico, V (en Voltios)
 - ⇒ Bajo voltaje (normal): 10500 V
 - ⇒ Alto voltaje: 50010,000 V
 - ⇒ Intensidad, i (en Amperios)
 - ⇒ Relacionada con V a través de la resistencia R (en ohmios): Ley de Ohm: $V = i R$
 - ⇒ Temperatura
 - ⇒ El paso de corriente produce calor (efecto Joule)
 - ⇒ Soporte
 - ⇒ Adsorción inespecífica (efecto negativo)
 - ⇒ Tamizado molecular, en geles de poliacrilamida
 - ⇒ **Factores de la disolución**
 - ⇒ Electroforesis → hidrólisis en electrodos → producción de H^+ y OH^-
 - ⇒ Es necesario un tampón
 - ⇒ Tampón continuo o discontinuo
 - ⇒ La fuerza iónica
 - ⇒ Influye en la esfera de solvatación
 - ⇒ Afecta a la conductividad
 - ⇒ El pH
 - ⇒ Determina la carga de las moléculas → FUNDAMENTAL
 - ⇒ **Moléculas de la muestra**
 - ⇒ ↑ Carga, ↓ Tamaño → ↑□□

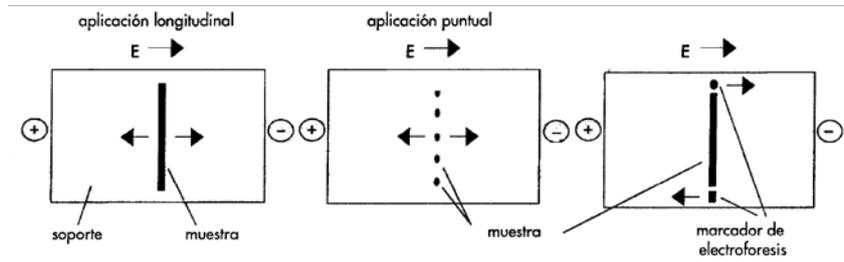
El Soporte

- ⇒ Compatible con el disolvente
- ⇒ Inerte al proceso de migración
 - ⇒ No cargado
 - ⇒ No adsorbente
- ⇒ Tipos de soporte
 - ⇒ No restrictivos
 - ⇒ No impiden el paso de las moléculas
 - ⇒ Agarosa
 - ⇒ Papel: poco utilizado
 - ⇒ Acetato de celulosa:
 - ⇒ Grosor y tamaño de poro controlado
 - ⇒ Transparente por deshidratación
 - ⇒ Utilidad: Análisis clínico de suero, orina, etc.
 - ⇒ Restrictivos
 - ⇒ Geles de poliacrilamida
 - ⇒ El tamaño del poro impone resistencia al paso de las moléculas
 - ⇒ Distinta migración según su tamaño
 - ⇒ Minimiza problemas de difusión y convección

Electroforesis en Acetato de Celulosa

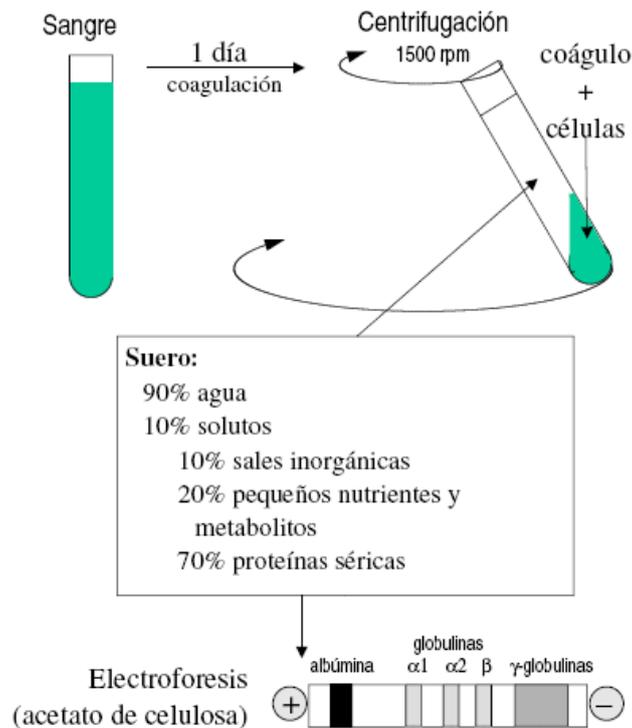
- ⇒ Útil para proteínas
 - ⇒ Poli electrolitos
 - ⇒ La carga depende:
 - ⇒ Del punto isoelectrico de la proteína
 - ⇒ Depende del contenido en aminoácidos protonables
 - ⇒ Ácidos (Glu, Asp)
 - ⇒ Básicos (Arg, Lys, His)

- ⇒ Del pH del medio
- ⇒ Tamaño mucho menor que los poros del soporte
 - ⇒ Separación depende sólo de la densidad de carga
 - ⇒ Relación carga/masa al pH considerado
- ⇒ Aplicación de las muestras

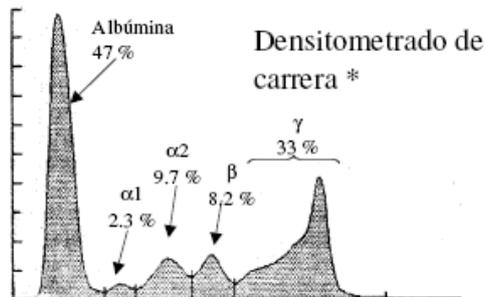


- ⇒ **Marcador electroforético**
 - ⇒ Molécula coloreada de mucha carga y pequeño tamaño. Permite observar el frente de avance
 - ⇒ Dinitrofenilisina (DNPLys)
 - ⇒ Azul de bromofenol
- ⇒ **Tratamiento postelectroforesis**
 - ⇒ Fijación: precipitación (TCA, ácido acético o metanol)
 - ⇒ Tinción con colorante
 - ⇒ Negro amido
 - ⇒ Azul coomassie
 - ⇒ Rojo Ponceau
 - ⇒ Decoloración
- ⇒ **Análisis**
 - ⇒ Densitometrado

Obtención del Suero



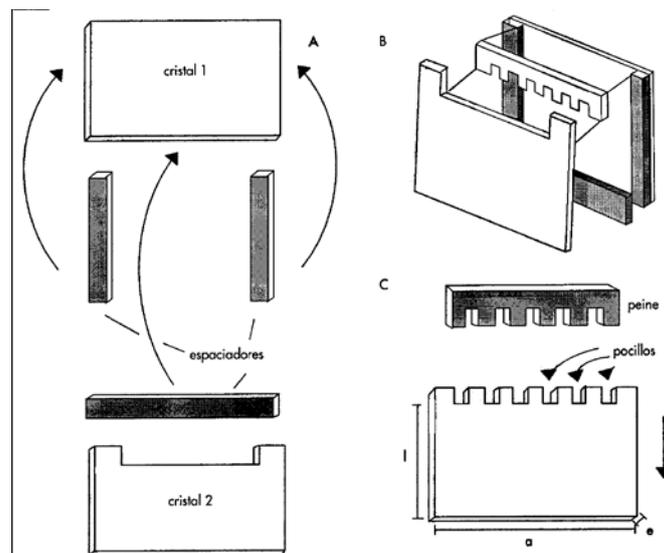
Electroforesis de suero en acetato de celulosa



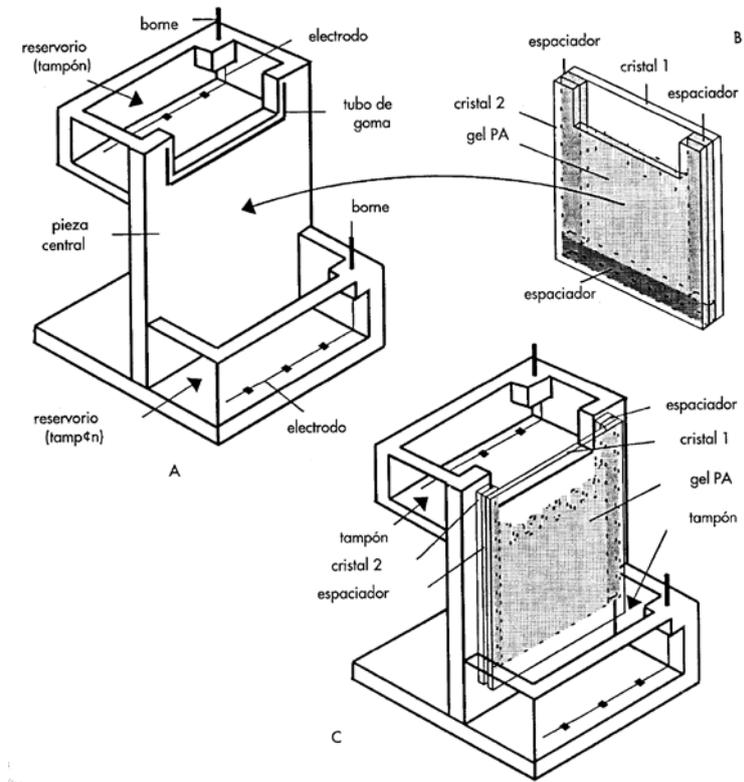
Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE)

- ⇒ Minimiza difusión y convección
- ⇒ Separación por carga y por tamaño
- ⇒ Soporte inerte, transparente y estable
- ⇒ Fácil de preparar con tamaños de poro variados
- ⇒ Preparación del soporte:
 - ⇒ Polimerización de acrilamida entrelazando con bisacrilamida
 - ⇒ Control del reticulado a través del % de monómeros
 - ⇒ Geles homogéneos
 - ⇒ Una única concentración de acrilamida
 - ⇒ Geles en gradiente
 - ⇒ Concentración de acrilamida variable
 - ⇒ Mayor resolución
 - ⇒ Sistemas de tampón discontinuo
 - ⇒ Efecto de concentración de la muestra (mayor resolución)
- ⇒ Tinción
 - ⇒ Azul coomassie (0,10,5 μ g por banda)
 - ⇒ Sales de plata (hasta 0,1 ng por banda)

Preparación de Geles de Poliacrilamida



Sistema de Electroforesis para Geles de Poliacrilamida



Condiciones Desnaturalizantes

- ⇒ En presencia de SDS
 - ⇒ Complejos SDSproteína. Se separan sólo según su tamaño molecular
- ⇒ En presencia de agentes reductores (DTT o β -mercaptoetanol)
 - ⇒ Rotura de puentes disulfuro intra e intermoleculares
 - ⇒ Observación de cadenas monoméricas

Estimación de masas moleculares

