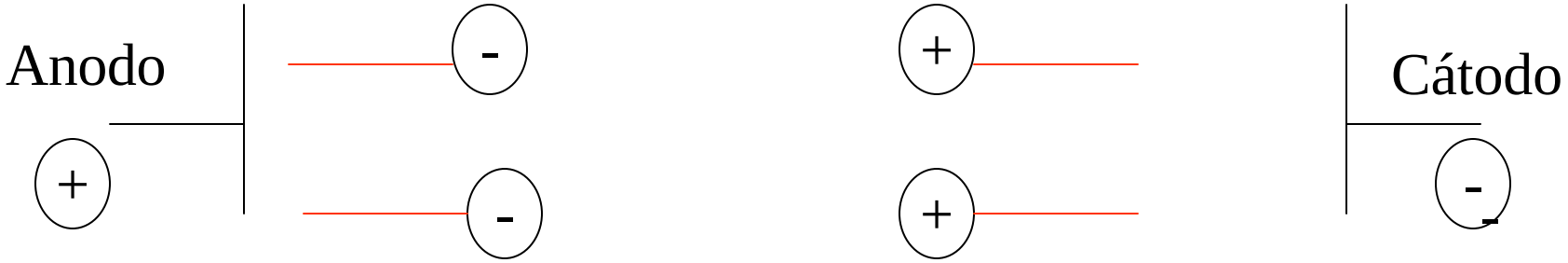
# GENERALIDADES Y APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS

Electroforésis — Separación de especies cargadas (anión (-) y catión (+) )

Influencia de campo cargado eléctricamente

Movimiento al cátodo (-) o al anodo (+)




Moléculas — carga neta nula — no se mueven

El movimiento de la molécula tiene una velocidad

Velocidad de migración (V) sus unidades cm.S-1

valor característico de la molécula y del campo eléctrico

Molécula en medio líquido

$$V \alpha E$$

la Velocidad de migración aumentara con la subida del campo eléctrico generado por una fuente exterior al sistema (Voltaje)

Luego $V = \mu \times E$, donde $\mu$ es constante

Movilidad electroforética (μ) $\left\{ \frac{\text{cm S-1}}{\text{V cm-1}} \right.$

Relación entre

la Velocidad de migración (cm S-1)

fuerza del campo eléctrico (V cm-1)

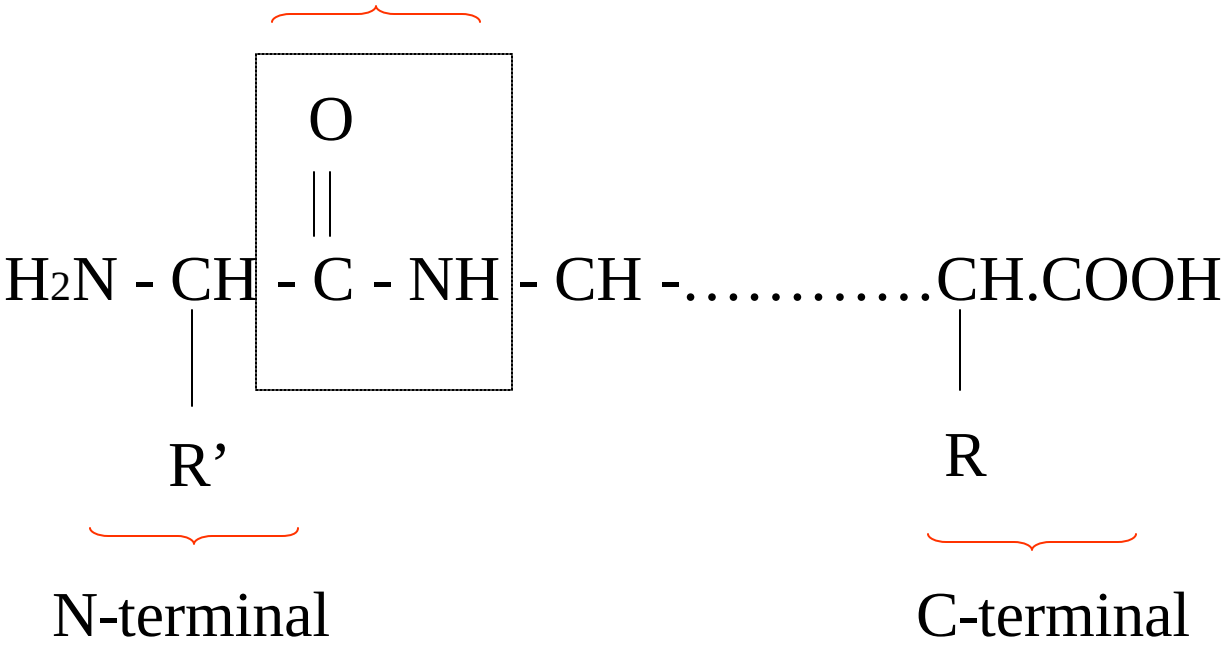
Carga neta ( Q ) ——— es la que determina el signo de la molécula

⇩

movimiento

La cadena primaria de las proteínas, está constituida por amino ácidos unidos por enlaces peptídicos

Enlaces peptídico



Constante de ionización de los amino ácidos (pK) son dos

grupo amino

grupo carboxilico

amino ácidos libres

Carga neta de la molécula (solución acuosa) — depende —

- pH
- características de ionización
- constituyentes amino ácidos

A valores bajos de pH

Grupo libre del Ac. Carboxilico será ionizado, el grupo amina protonado

⇩

Proteína con carga positiva

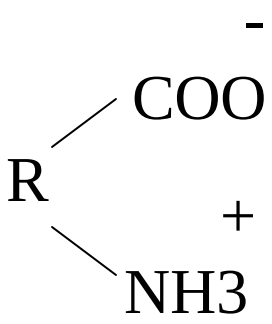
## A valores altos de pH

Grupo libre del Ac. Carboxilico será ionizado, el grupo amina no estará protonado

⇩

Proteína con carga negativa

# Proteína con carga nula




Punto isoeléctrico o pHi

Estructura de Zwiterion

- pH < pHi molécula migrara hacia el cátodo (-)
- pH > pHi molécula migrara hacia el anodo (+)

Viscosidad de arrastre —— es la fricción de la molécula al moverse en el medio

Viscosidad de arrastre { viscosidad del medio
talla y forma molécular (radio)

Para que la Velocidad de migración se mantenga constante

- ✓ viscosidad de medio ($\eta$ )
- ✓ fuerza aplicada sobre el campo eléctrico (E)
- ✓ carga neta de la molécula (Q)
- ✓ talla y forma de la molécula (radio)

La velocidad de migración en un sistema electroforético es

- Inversamente proporcional a la viscosidad del medio
- ✓ Proporcional a la fuerza aplicada al campo
- ✓ Proporcional a la carga neta de la molécula
- ✓ Inversamente proporcional a la talla de la molécula, forma también tiene este efecto

# ELECTROFORESIS

## ANALITICA

Separación de compuestos

en diversas mezclas

Identificación de los compuestos separados

Métodos ópticos
Métodos radio químicos
Métodos de ensayos biológicos

## PREPARATIVA

Obtención de las proteínas o polinucleotidos

Recuperación de las mismas para estudios o aplicaciones deversas

# TIPOS DE ELECTROFORESIS

- Banda
- Zona
- Estado estacionario o fijo

- Isoelectrofocalización
- Isotocoforesis

Electroforésis de banda

Investigación sobre proteínas

ponen en las celdas
solución buffer
aplica voltaje
baño termoregulado

Separación de las diferentes especies

Métodos químicos
o biológicos

# Electroforésis de Zona

La separación se produce a través de zonas nítidas

Se tomara en cuenta:
- medios de soporte
- gradientes de densidad
- técnicas de zona libre

Medios de soporte — medio poroso
- papel de filtro
- film de acetato de celulosa
- gel

Gradiente de densidad

columna de gradientes evita las corrientes de convección

perturban

Sol. Glicerol, sacarosa, etilen glicol

solubles y no ionizados

## Electroforésis en estado estacionario:

Se obtiene un estado estacionario después de la electroforesis

Isoelectrofocalización — gradiente de pH — entre el anodo y el catodo

Campo eléctrico

Isotocoforésis — separación de moléculas cargadas de masa lecular pequeñas (drogas y polipéptidos)

Se colocan los componentes cargados, unos detrás de las otras de acuerdo a su movilidad electroforética.

# MEDIOS DE SOPORTE USADOS EN ELECTROFORESIS DE ZONA

Papel Filtro

Método sencillo y rápido

Se usa para la separación de

proteínas oligonucléotidos carbohidratos lípidos

Desventajas:

- si el papel es fino, se puede desgarrar con facilidad
- si el papel es grueso, las bandas se distorsionan
- se produce interacción entre las proteínas y los grupos hidroxilos de la celulosa del papel, por lo tanto la migración se frena
- calidad del papel 90% de $\alpha$ de celulosa absorción de agua y conductividad eléctrica
- efecto eléctro osmótico ánodo - cátodo

- Acetato de celulosa ——— se usa en análisis de fluídos biológicos
  corridas de corto tiempo
  cantidades pequeñas

gran parte de los grupos hidroxil de la celulosa se han esterificado por acetilación ——— no hay interacción con las proteínas

Desventajas.

Puede contener algunos grupos ——— Ac. Carboxilico y sulfatos
Fen. Eléctro ósmosis

Geles —— son polímeros de red tridimensional —— est. aleatoria

Bañado en buffer
No es de tipo granular

Factores que influyen en la migración de la muestra en los geles

resistencia o fricción a éste movimiento
- talla de los poros del gel
- radio de la molécula

- Geles
  - Almidón
    - Técnica
    - barata, fácil
    - rápida
  - poliacrilamidas
  - agarosa
    - Polímero lineal
    - D galactosa y 3,6 anhidrogalactosa
  - agarosa-poliacrilamidas

Geles de poliacrilamida

Ventajas

la concentración de poliacrilamida puede variar sin límites (no almidón)

mejor manejo del gel

la adsorción de proteínas es despreciable

# Preparación de los geles.

Acrilamida + N,N'metilenbisacrilamida

iniciador

persulfato de amonio o de potasio

catalizador

(enlaces cruzados)
N,N,N',N',tetrametiletilendiamina (TEMED)

factor crítico para talla de los poros — relación agentes enlaces cruzados y la acrilamida

# Geles de poliacrilamida

Electroforésis de disco

- Técnica de alta resolución
- En corto tiempo
- Minimiza la difusión en las zonas separadas

2 geles

gel inferior
gel de separación

tamizado moléc.
[ ] 15% p/v

gel superior
gel pre-conc

[ ] 2,5% p/v

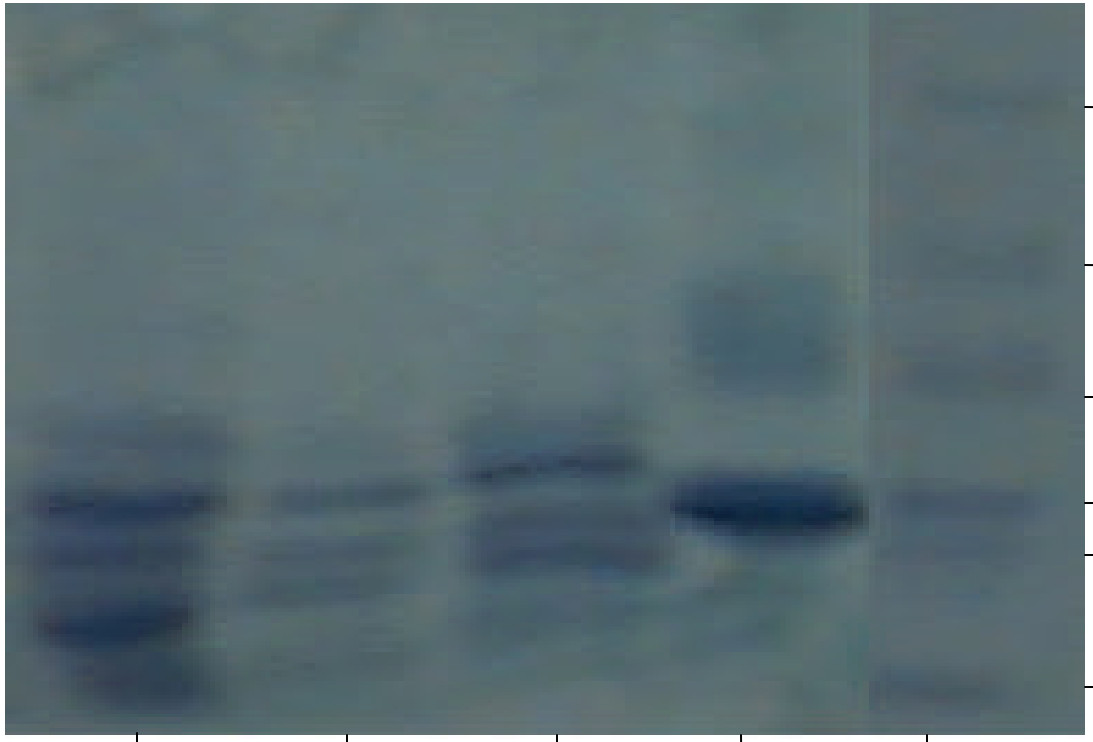
# Electroforésis en gel SDS PAGE

- Eliminación de la carga por complexación con detergente aniónico SDS a pH neutro

- 2 mercapto etanol disociante proteínas destruye los puentes disulfuros

y el SDS se une a las cadenas polipéptidicas por enlaces hidrofóbos

# Trabajo de laboratorio



94.000 D

67.000 D

43.000 D

30.000 D

20.100 D

14.400 D

Aislado de Avellana 5 µl

Avellana en agua 5 µl

Avellana en tampón 5 µl

Caseína 10 µl

Patrones de peso molecular 2 µl