

# ELECTROFORESIS

---

## Objetivo de la clase

Conocer los métodos electroforéticos

- \*fundamentos
- \*procedimientos
- \*algunas aplicaciones

# Definición de electroforesis

---

**Proceso de separación que se basa en la diferente velocidad de migración que poseen las moléculas cargadas (iones) cuando son sometidas a la acción de un campo eléctrico.**

$$V_{\text{ión}} = \mu_{\text{ión}} \times E$$

**v:** velocidad de migración iónica

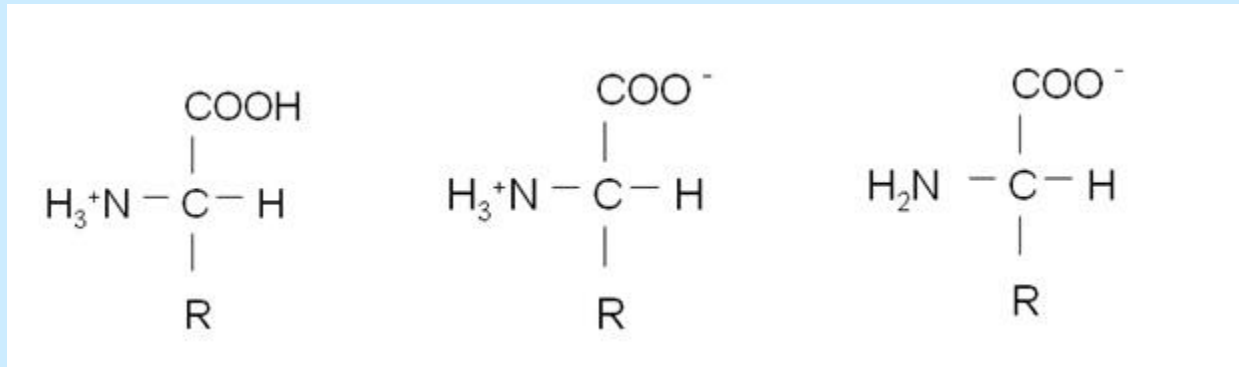
**$\mu$ :** movilidad iónica (depende de la carga, peso molecular y forma del ión) \*

**E:** campo eléctrico aplicado, definido por  $V/L$  (voltaje aplicado dividido la distancia en la cual se aplica el voltaje)

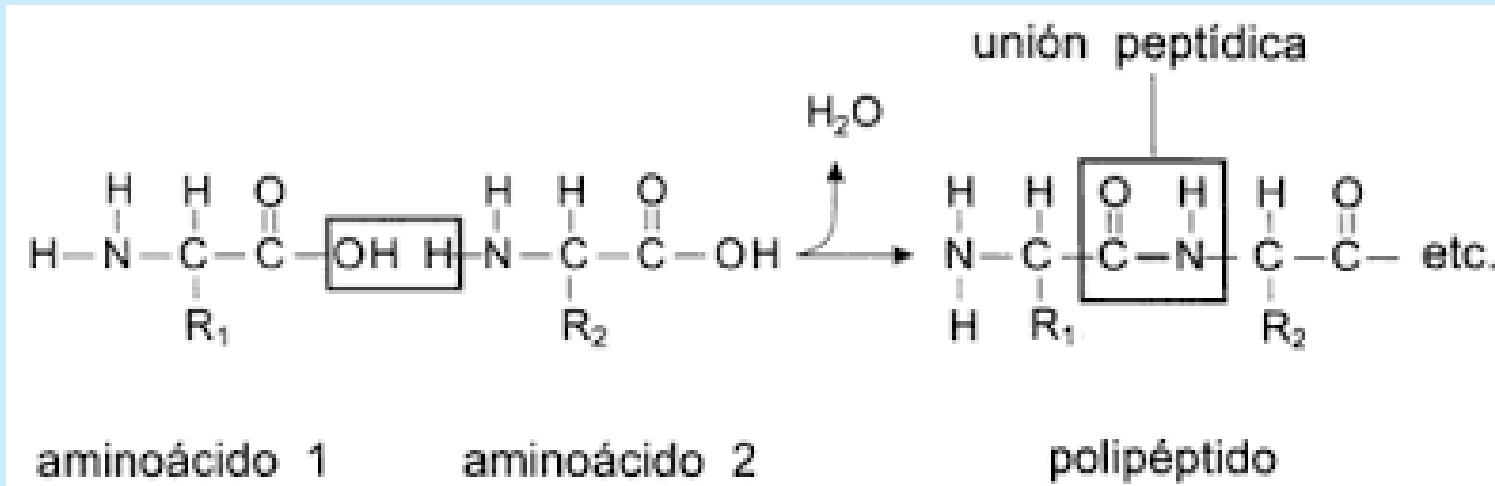
**\*pH y la fuerza iónica del medio líquido en el que se produce la separación**

# Aminoácidos y proteínas

- ✓ Cargas en función del pH del medio
- ✓ Punto isoeléctrico: pI



aa

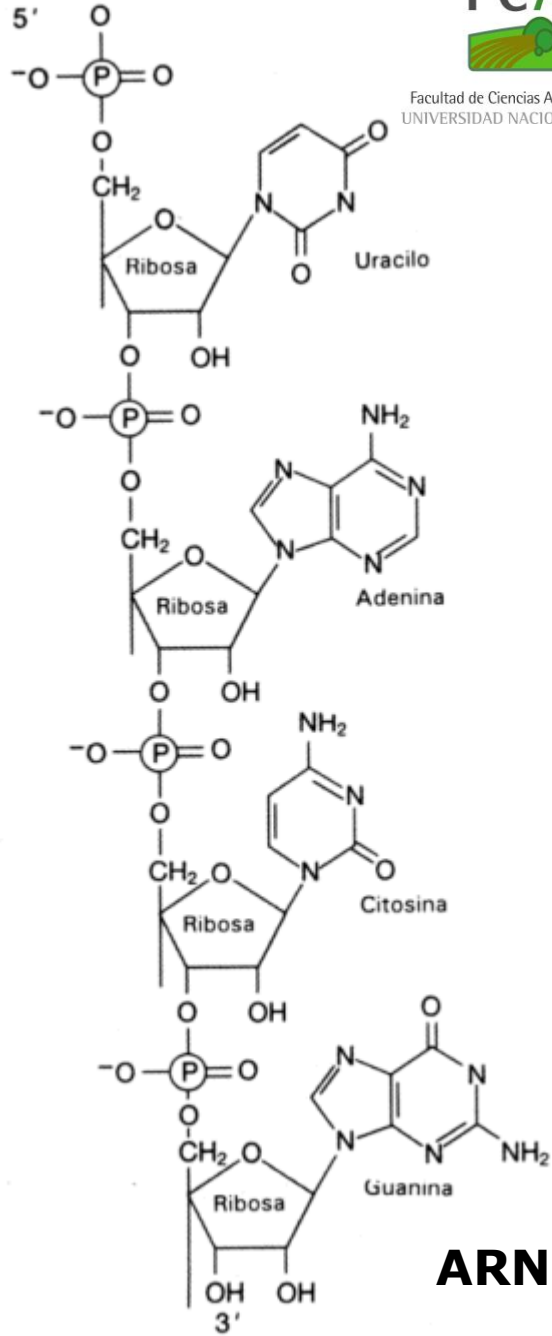
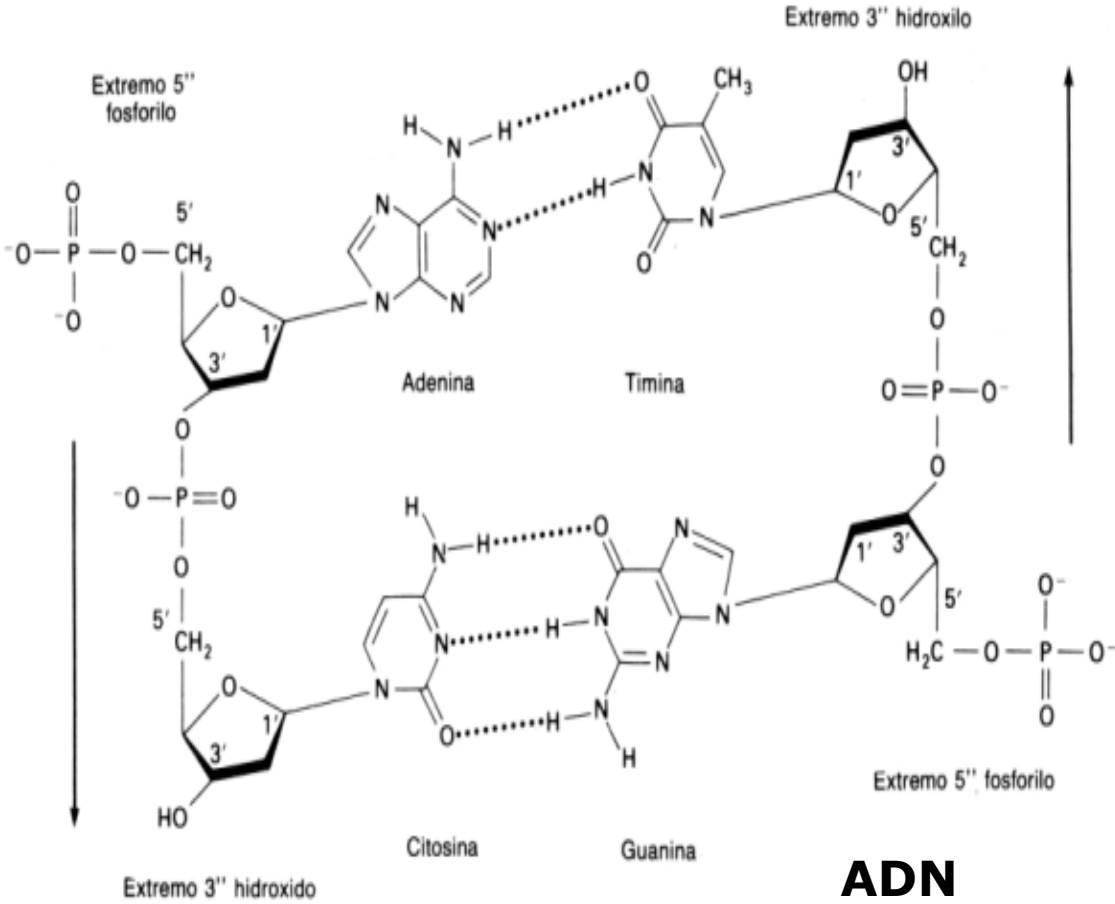


Proteínas

pI

# Ácidos nucleicos

✓ Cargas negativas de los grupos fosfato



# SOPORTES

---

## ✓ Semisólidos

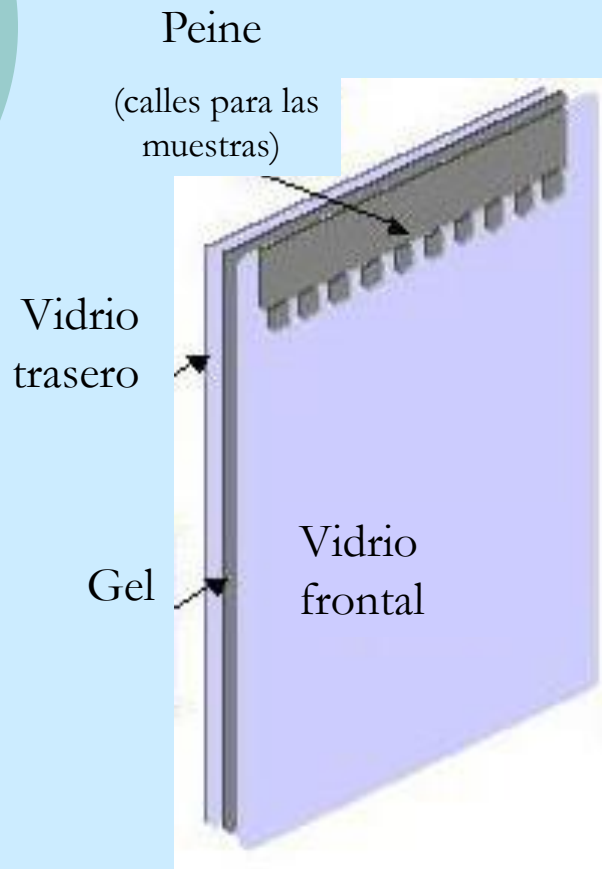
**Gel de agarosa (AN)**

**Gel de poliacrilamida –PAGE  
(proteínas)**

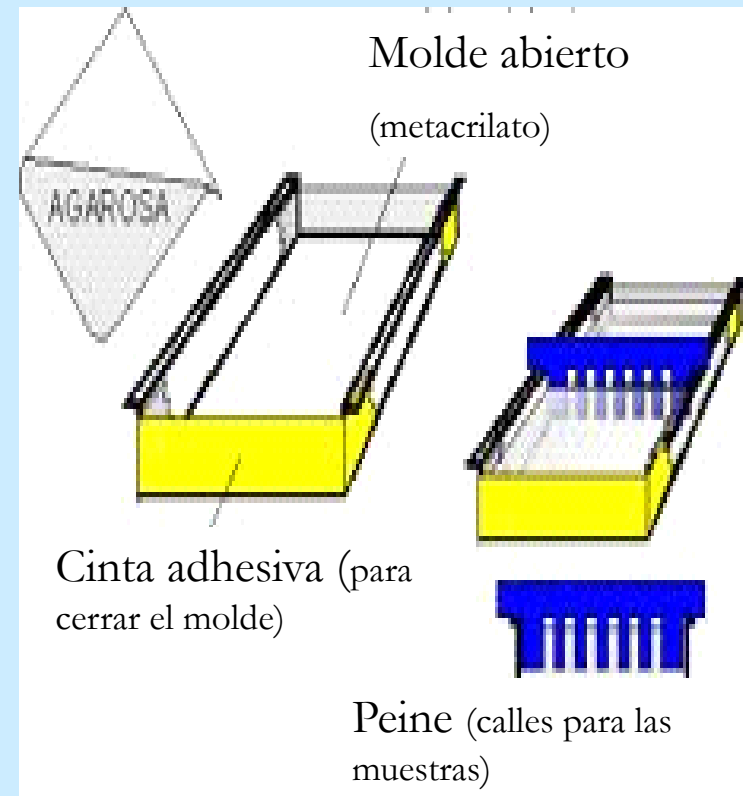
} moldes para armar los geles

# MOLDES PARA ARMAR LOS GELES

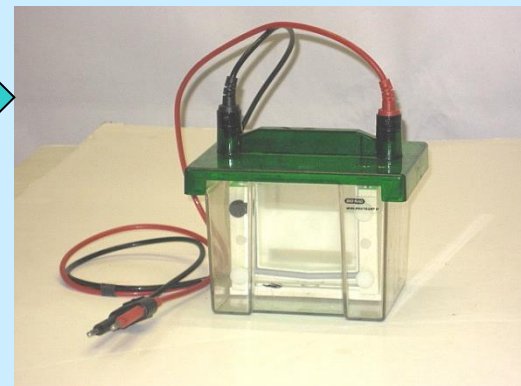
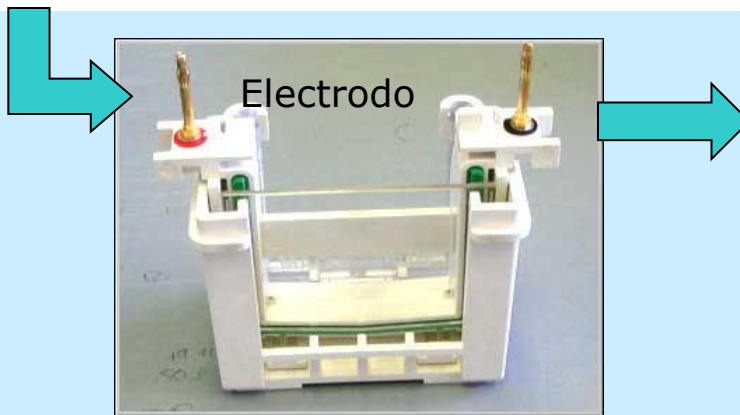
## Vertical (proteínas)



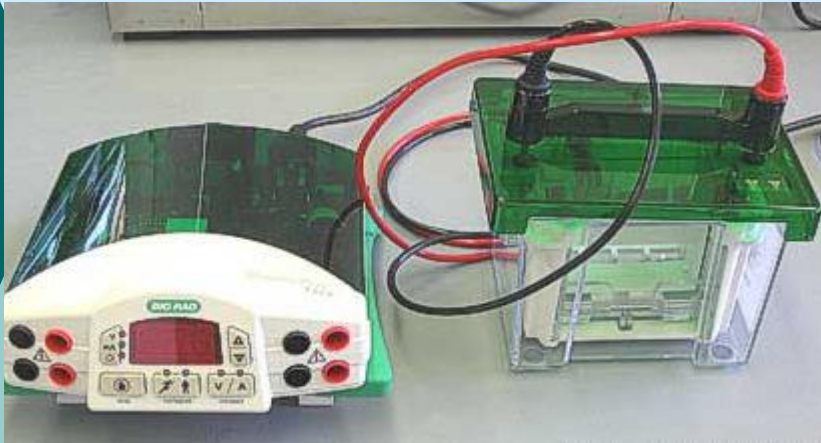
## Horizontal (ácidos nucleicos)



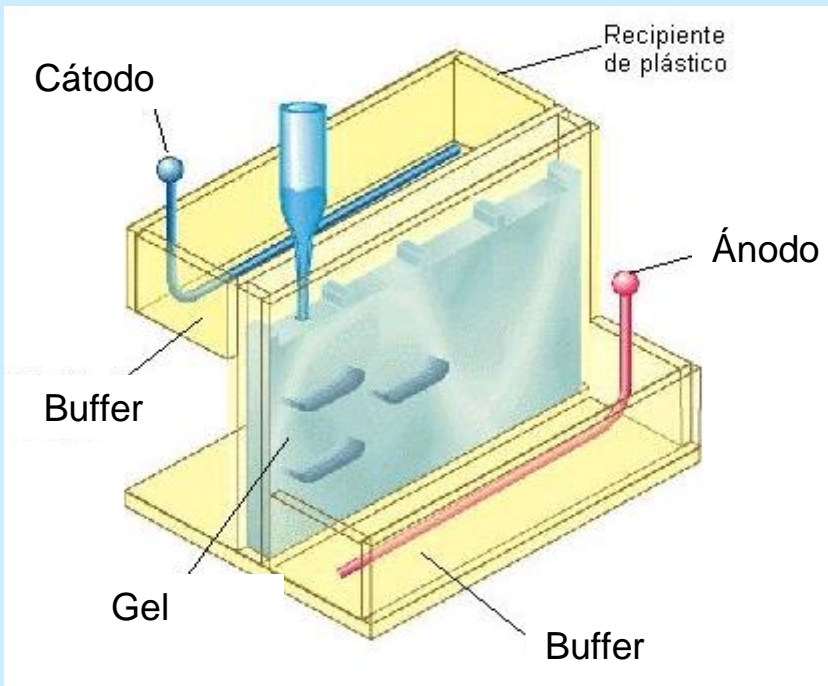
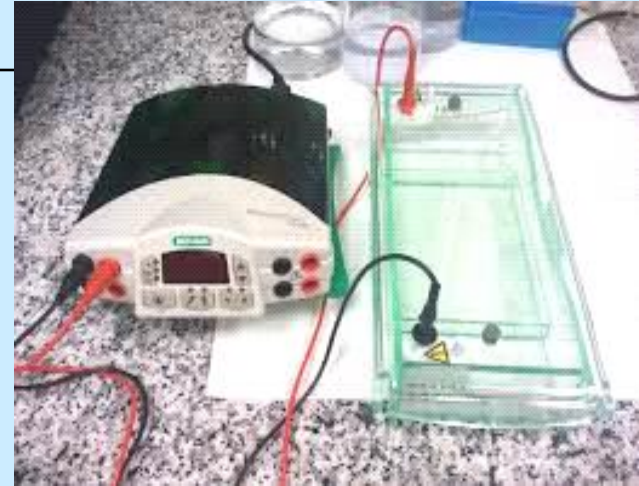
# Equipos para realizar electroforesis vertical



# Vertical



# Horizontal





# Existen diferentes formas de realizar una electroforesis:

---

**I- Electroforesis de zona (es la más difundida)**

**separa por la relación carga/masa**

**II- Electroforesis de estado estacionario (isoelectroenfoque)**

**separa proteínas en función de su punto isoeléctrico**

# I- Electroforesis de zona

## PROTEINAS

---

- 1- Armado del gel vertical de poliacrilamida
- 2- Armado del equipo de electroforesis con el buffer de corrida
- 3- Siembra de las muestras a analizar
- 4- Aplicación del campo eléctrico
- 5- Finalizar la corrida cuando el "frente de corrida" llegue al extremo inferior del gel

# I- Electroforesis de zona

## PROTEINAS

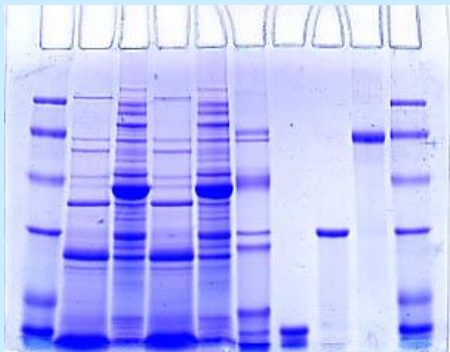


# I- Electroforesis de zona

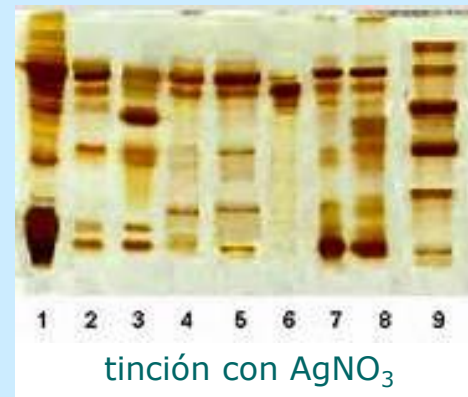
## PROTEINAS

6- Retirar el gel cuidadosamente

7- Etapa de revelado (tinción con Azul Brillante de Coomasie; tinción con  $\text{AgNO}_3$ )  
(reacciones enzimáticas de color, inmunodetecciones)



Azul Brillante de Coomasie

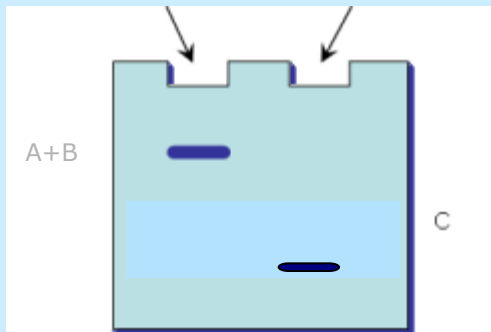
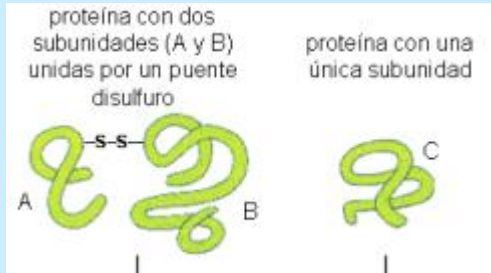


tinción con  $\text{AgNO}_3$

# I- Electroforesis de zona

## PROTEINAS

### Electroforesis nativa



**Carga, peso molecular y forma**

### Electroforesis desnaturizante



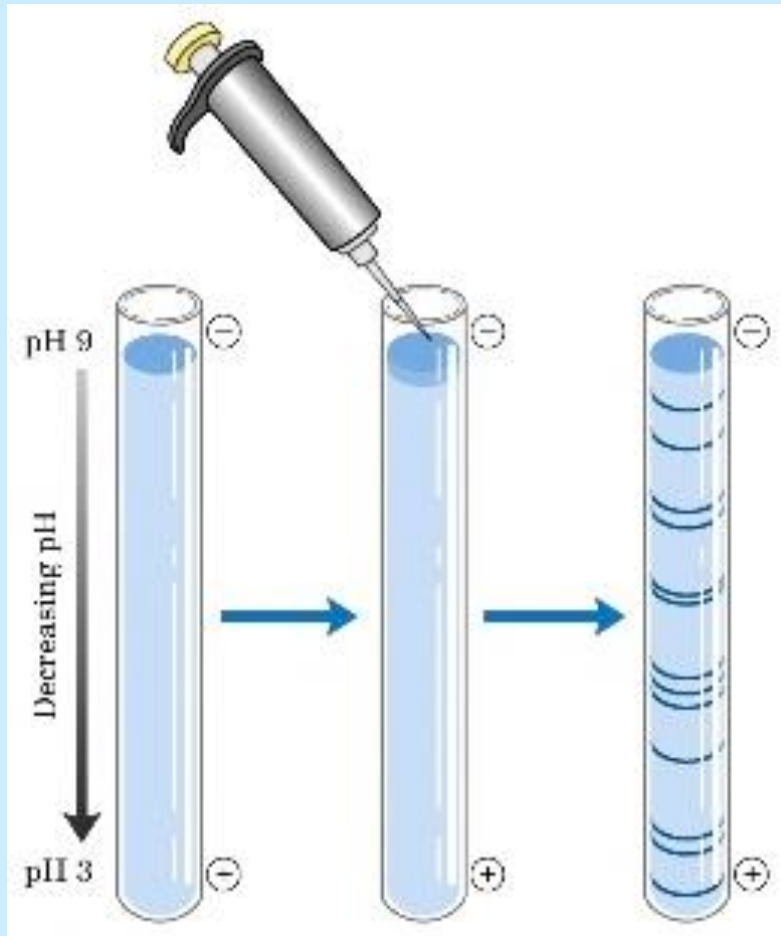
**SDS  
anula el  
efecto  
carga**

**Peso molecular**

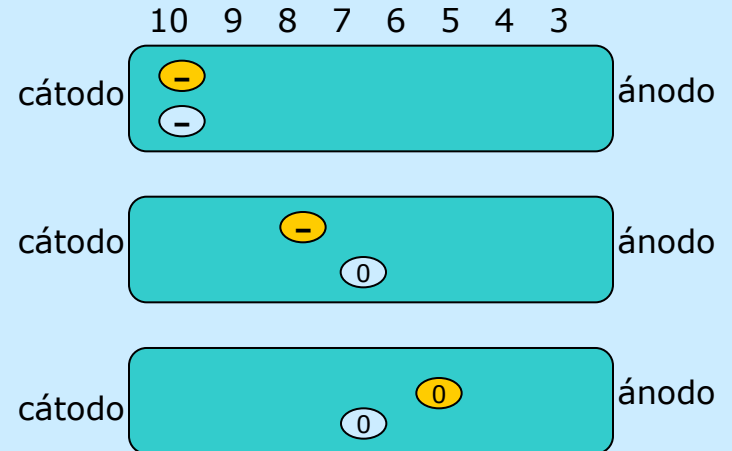
# II- Electroforesis de estado estacionario (isoelectroenfoque)

## PROTEINAS

Separa en función del punto isoelectrico de cada proteína



Gradiente de pH inmobilizado en un gel PAGE + anfolitos

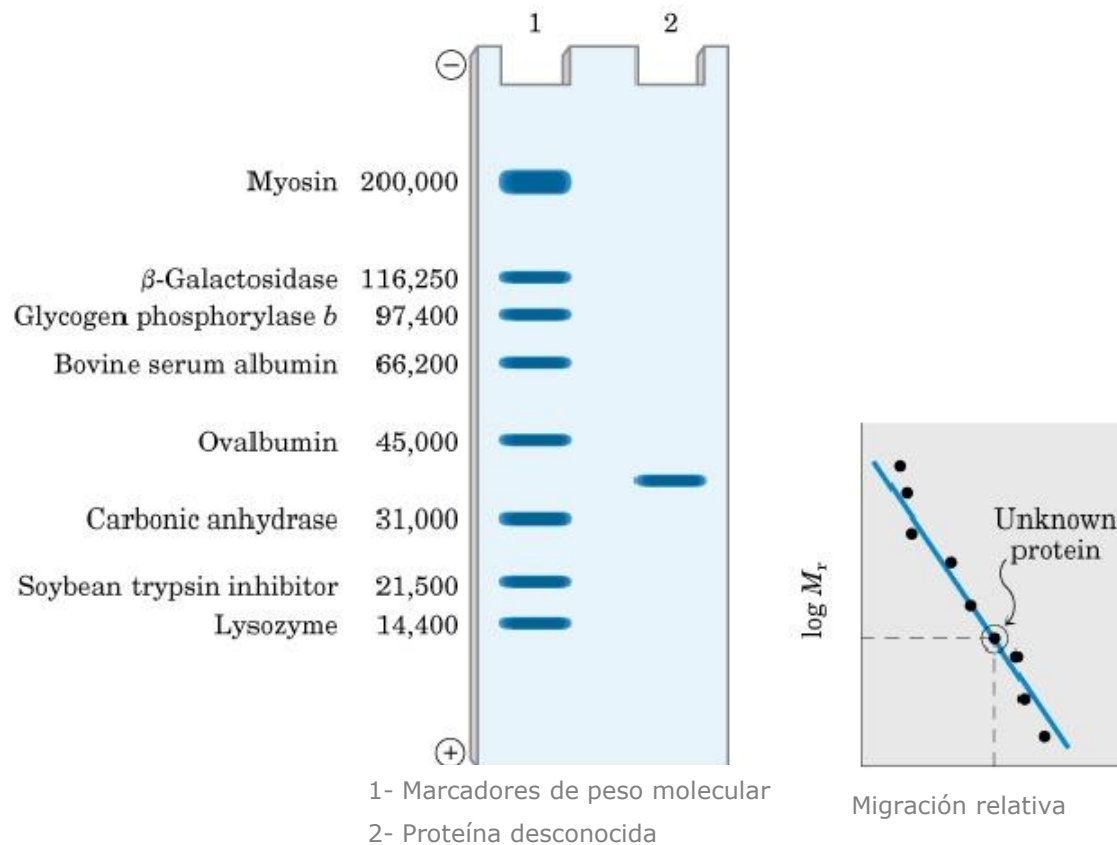


○ Proteína con pI entre 6 y 7

● Proteína con pI entre 5 y 6

# Aplicaciones

## Caso 1- Determinar el peso molecular de una proteína Se usa una electroforesis desnaturalizante.



# Aplicaciones

## Caso 3- Diagnóstico de microorganismos fitopatógenos



**Podredumbre morena**

**hongo del género *Monilinia***

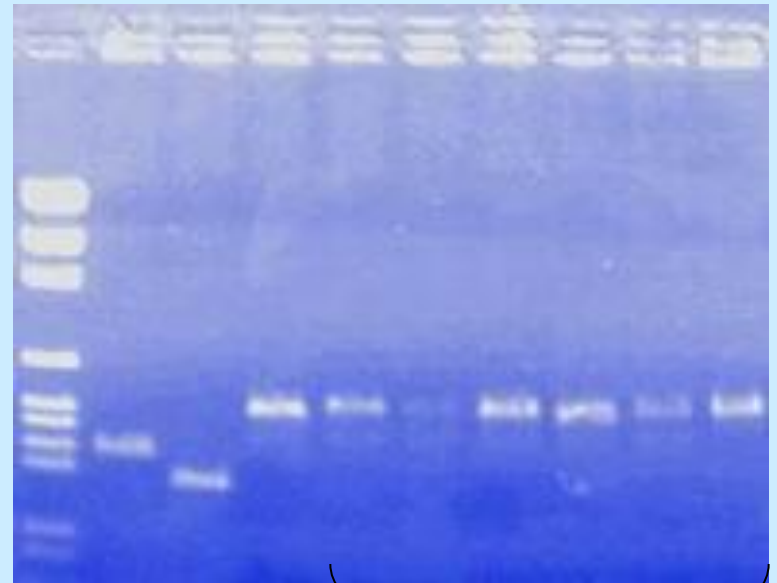
***M. frutigena***

***M. laxa***

***M. fructicola***

- 1: marcadores de peso molecular
- 2: fragmento de ADN que identifica a *frutigena*
- 3: fragmento de ADN que identifica a *laxa*
- 4: fragmento de ADN que identifica a *fructicola*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Muestras de ADN obtenidas de duraznos uruguayos enfermos

5-10



# Bibliografía

---

**-Mikkelsen y Cortón. Química Bioanalítica. Métodos y teoría analítica para el laboratorio de biología molecular, farmacia y bioquímica. Primera edición 2011. Editorial EUDEBA.**

**-Voet, Voet y Pratt. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. Segunda edición 2007. Editorial Médica Panamericana SA.**

**-Methods in Plant Biology. A laboratory course manual. Maliga, Klessing, Cashmore, Grissem and Varner. 1995. Cold spring harbor laboratory press.**

**-Harris. Análisis Químico cuantitativo. Segunda edición en castellano 2001. Editorial Reverté SA.**

## **-VIDEOS YouTube**

**-Electroforesis de proteínas (tutorial). Divulgación científica. IQOG-CSIC. Publicado en febrero de 2015. Acceso en abril de 2017. 10 min.**

**-Electroforesis en gel de agarosa. Universidad Politécnica de Valencia. Acceso en abril 2017. 7 min.**