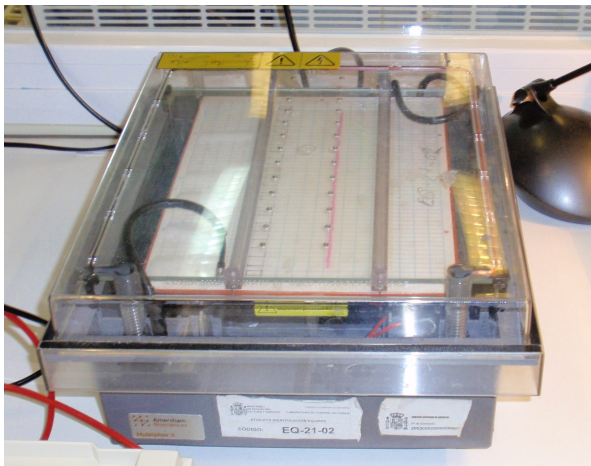


MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

La electroforesis es un método analítico en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su relación tamaño a carga eléctrica, usándose como base una matriz gelatinosa.



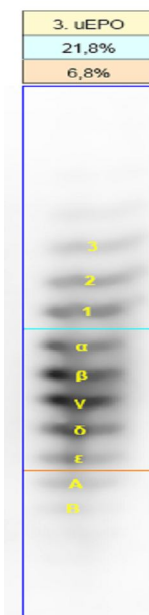
Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son posicionadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (polo negativo) y aquellas cargadas positivamente se desplazarán hacia el ánodo (polo positivo), ver figura.

El soporte sobre el que tiene lugar el desplazamiento de las especies es un gel de poliacrilamida, este tipo de análisis se caracteriza porque:

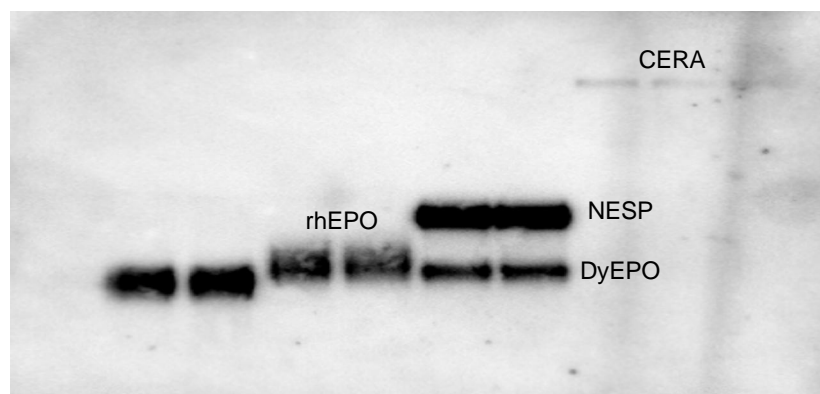
- La migración es proporcional a la carga neta, el tamaño y la forma de la proteína.
- Los geles son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica.
- Los geles de poliacrilamida (PAGE) se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador (TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^-$), que se añade en forma de persulfato amónico.

- En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalización) a lo largo del proceso electroforético, éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes:
 - En una **electroforesis desnaturalizante**, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma.
 - En una **electroforesis nativa** a las proteínas se les somete a una migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos.

Los tipos de electroforesis, usadas en el Laboratorio Control de Dopaje son; Electroforesis en geles de poliacrilamida por **Isoelectroenfoque (IEF-PAGE)** y Electroforesis en geles de poliacrilamida por **SDS-PAGE**. Ver figura siguiente.



Análisis por IEF



Análisis por SDS-PAGE

El uso de la electroforesis por **IEF-PAGE** está limitado a moléculas que pueden estar cargadas positivas o negativamente. Proteínas, enzimas y péptidos son moléculas anfóteras. La carga neta de una proteína es la suma de todas las cargas positivas y negativas de la cadena lateral de aminoácidos, pero la configuración de la proteína también juega un papel. Para proteínas tales como glyco- o nucleoproteínas, la carga neta está también influenciada por el azúcar o por el grupo funcional del ácido nucléico. La degradación de la fosforilación también tiene una influencia sobre la carga neta. El Isoelectroenfoco es uno de los mejores procedimientos para el aislamiento de proteínas.

El análisis por electroforesis con SDS, se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. El SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación de 1,4g de SDS por gramo de proteína, uniéndose una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Ésta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo.