

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Con fundamento en el numeral 4.11.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2010, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de agosto y hasta el 30 de septiembre de 2015, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, México, D.F. Fax: 5207 6890
Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

MGA 0311. ELECTROFORESIS

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada eléctricamente cuando ésta se somete a un campo eléctrico, moléculas biológicamente importantes como el DNA, RNA y proteínas, poseen cargas eléctricas y por ende pueden moverse cuando se someten a un campo eléctrico; históricamente el primer método electroforético se realizó en una solución de sacarosa en la que se movían libremente (electroforesis libre) los componentes por analizar cuando se aplicaba un campo eléctrico.

La electroforesis libre presentaba varios problemas principalmente el ser de baja resolución, pero poco tiempo después aparecieron nuevos métodos electroforéticos los cuales hacen uso de diversos tipos de soporte como son: papel, acetato de celulosa, almidón, agarosa, poliacrilamida, etc. El fin de usar un medio de soporte para realizar la electroforesis, es el de eliminar la difusión de las muestras, en tal forma que los componentes ya separados permanecen en una zona "estrecha" (electroforesis zonal) lo que conduce a una máxima resolución entre ellos.

El medio de soporte usado para la electroforesis influye en la movilidad y en la capacidad de resolución, esto puede deberse a la adsorción de las moléculas al soporte, falta de homogeneidad del material utilizado como soporte y electroendósmosis. Los dos primeros factores no requieren de mayor explicación y en el caso de la electroendósmosis, esto es debido a la existencia de grupos químicos cargados eléctricamente en las moléculas que constituyen el soporte, por ejemplo, el papel tiene un número reducido de grupos carboxilo y en el caso de la agarosa, ésta tiene grupos sulfónicos; en reguladores neutros o básicos, estos grupos se ionizan y serán atraídos hacia el ánodo (+) durante la electroforesis. Sin embargo la atracción de estos grupos no es posible puesto que se trata de un soporte sólido, de tal manera que este efecto es compensado por una migración de iones H⁺ hacia el cátodo (-), que resulta en un movimiento efectivo del disolvente, debido a esto, moléculas sin carga eléctrica a ese pH son arrastradas por el disolvente hacia el cátodo.

En virtud de todo lo anterior, el medio de soporte de elección para la electroforesis deberá ser químicamente inerte durante el proceso de separación uniforme en sus propiedades y ser de preparación fácil y reproducible.

Los medios de soporte más comúnmente usados son papel, acetato de celulosa, gel de almidón, agarosa o gel de poliacrilamida. Al final del corrimiento, el soporte puede ser teñido o usado para autorradiografía y/o conservación.

El uso de los diferentes soportes para electroforesis ha dado lugar a una gran variedad de aplicaciones de la misma. A continuación se presentarán sólo las de uso común.

EQUIPO

1. Fuente de poder adecuada que administre una corriente constante directa y aditamentos para indicar y controlar tanto el voltaje que se suministra como el consumo de corriente. Se puede adicionar un circuito que establezca la salida de corriente (regulador de voltaje).

2. Ensamble electroforético con aditamentos apropiados para soportar las placas electroforéticas.

Para la electroforesis en donde se utilice papel o acetato de celulosa como soporte electroforético, el ensamble consiste de un tanque con tapa de vidrio o de otro material que permita el cerrado hermético. El tanque contiene aditamentos de seguridad los cuales desconectan la fuente de energía cuando se quita la tapa. Tiene además, dos dobles canales en cada extremo provistos de una parte divisoria central.

A lo largo del fondo de uno de los compartimientos de cada doble canal se encuentra un electrodo de platino conectado por medio, de cables aislados y sellados a las paredes del tanque, al cable externo conectado a la fuente de poder. Los canales se llenan con suficiente cantidad de la solución de electrólitos especificada en la monografía, para asegurar la inmersión completa de los electrodos.

El contacto entre el compartimiento interno y el externo de cada doble canal puede ser por medio de un puente de papel electroforético o bien mediante pequeñas perforaciones de la parte central divisoria.

Para electroforesis en gel de poliacrilamida el ensamble consiste en dos envases de polimetilmetacrilato para la solución amortiguadora, conteniendo cada uno un electrodo de platino. El envase superior está montado verticalmente arriba del inferior y su altura es ajustable. En su base, tiene una serie de soportes de hule situados equidistantes del electrodo. Los electrodos están conectados, por medio de cables aislados, a la fuente de poder de tal forma que el cátodo se encuentra en el envase superior y el ánodo en el inferior.

3. Soporte electroforético.

Para electroforesis en papel y en acetato de celulosa, el soporte electroforético es en forma de tiras sostenidas entre los canales sobre una superficie uniforme compuesta de puntos de contacto de plástico inerte o vidrio, espaciadas para minimizar la difusión capilar de la solución de electrólitos.

El soporte electroforético se conecta directamente (electroforesis en papel y en acetato de celulosa), al compartimiento de cada doble canal que no contiene el electrodo.

Para electroforesis en gel de poli(acrilamida) el soporte se genera por la polimerización de la acrilamida y la bis acrilamida, formando un gel que puede ser teñido o transferido a papel de nitrocelulosa lo que amplía la gama de aplicación.

MÉTODOS

ELECTROFORESIS EN PAPEL. Llenar los canales del tanque con la solución de electrolitos especificados en la monografía correspondiente. Aplicar los volúmenes de las soluciones, preparadas como se indica en la monografía correspondiente, a lo largo de la línea base del papel a 1 cm del borde y a no menos de 2.5 cm de distancia entre una y otra aplicación.

Dejar que las manchas se sequen y colocar el papel en el compartimiento apropiado, de tal forma que el extremo en donde se encuentra la línea base de aplicación quede en la pila donde se encuentra el ánodo y el otro extremo en la pila del cátodo. Humedecer el papel con la solución de electrolitos, teniendo cuidado de no humedecer la parte en donde se hizo la aplicación de las muestras.

Cerrar el tanque, dejar que la solución de electrolitos se difunda a partir de la línea base, si es necesario cubrir el aparato para protegerlo de la luz, conectar los cables a la fuente de poder y accionar el equipo. Ajustar el voltaje a aproximadamente 20 volts por centímetro de papel y dejar que se realice la electroforesis durante el tiempo indicado o hasta que las sustancias se muevan la distancia especificada en la monografía correspondiente.

Desconectar el equipo, sacar el papel de la cámara, secar bajo corriente de aire protegido de la luz y examinar el papel con una lámpara de luz UV.

ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA.

Llenar los canales del aparato con la solución de electrolitos especificada en la monografía. Sumergir la placa de acetato de celulosa de dimensiones adecuadas, durante 5 min en la misma solución y presionar las tiras secas entre el papel filtro. Aplicar en la placa 10 µL de cada una de las soluciones descritas en la monografía a 1 cm de la terminal del ánodo y a 2.5 cm de distancia entre una y otra.

Ajustar el voltaje al especificado en la monografía y dejar que se realice la electroforesis durante el tiempo indicado. Presionar las tiras secas, sumergirlas en una solución preparada disolviendo 1 g de hexacianoferrato de potasio en 50 mL de agua y añadir 2 mL de solución saturada de cloruro férrico. Lavar con una solución de ácido ortofosfórico al 5 % (v/v) hasta que el fondo sea de color claro y finalmente lavar con agua. Examinar el electroforetograma.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Existen dos métodos electroforéticos usando geles de poli(acrilamida) y varían en que uno se realiza en geles cilíndricos (electroforesis en disco) y el otro se realiza en geles en placa, ambos son técnicamente sencillos de efectuar y su

capacidad de resolución es similar, pero una mayor cantidad de muestra puede ser aplicada en los geles en placa, en comparación de los geles cilíndricos.

Una ventaja que tiene la electroforesis en placa es el número de muestras que pueden ser analizadas en una sola placa de gel y en esa forma todas están sujetas a idénticas condiciones y pueden ser comparadas por separado, de tal manera que una comparación exacta puede ser difícil, puesto que mantener las mismas condiciones en todos los geles a lo largo de la prueba no siempre es fácil.

Soluciones empleadas para la preparación de geles de poli(acrilamida):

- A) Solución de monómeros al 30.8 % de concentración total (2.59 % es aportado por la bis-acrilamida):
- | | |
|--|-------|
| Acrilamida | 30 g |
| Bis-acrilamida | 0.8 g |
| Llevar al aforo a 100 mL con agua destilada. | |
- B) Solución amortiguadora Tris HCl 1.5 M pH 8.8
- | | |
|--|----------|
| Tris (hidroximetil) amino metano | 18.171 g |
| Disolver en ± 50 mL, 60 mL de agua destilada y añadir ácido clorhídrico 1 N hasta ajustar el pH a 8.8 (aproximadamente 30 mL de ácido clorhídrico). Llevar al aforo a 100 mL con agua destilada. | |
- C) Solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
- | | |
|--|---------|
| Tris (hidroximetil) amino metano | 6.057 g |
| Disolver en ± 30 mL-40 mL de agua destilada y añadir ácido clorhídrico 1 N hasta ajustar el pH a 6.8 (aproximadamente 48 mL de ácido clorhídrico). | |
- D) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %.
- | | |
|--|------|
| Dodecil sulfato de sodio | 10 g |
| Llevar al aforo a 100 mL con agua destilada. | |
- E) Solución de persulfato de amonio al 10 %
- | | |
|--|--------|
| Persulfato de amonio | 0.1 g |
| Agua destilada | 1.0 mL |
| Preparar inmediatamente antes de usar. | |
- F) Solución amortiguadora para la muestra (2X usar tal cual)
- | | |
|--|-------|
| Solución amortiguadora Tris HCl pH 6.8 | 10 mL |
| Solución de SDS al 10 % | 10 mL |
| 2-mercapto etanol | 1 mL |
| Glicerol | 10 mL |
| Agua destilada | 19 mL |
- G) Solución amortiguadora Tris-Glicina-SDS pH 8.3
- | | |
|----------------------------------|--------|
| Tris (hidroximetil) amino metano | 3 g |
| Glicina | 14.4 g |

~~Dodecil sulfato de sodio~~ 0.1 g
 Dodecil sulfato de sodio 1 g
 Ajustar el pH a 8.3 y llevar al aforo a 1 000 mL con agua destilada.

H) Solución de azul de bromofenol al 0.5 % en glicerol al 20 %
 Azul de bromofenol 0.05 g
 Glicerol al 20 % en agua destilada 10 mL

Antes de preparar los geles debe asegurarse que todo el material a utilizar (vidriería y equipo de electroforesis) haya sido lavado cuidadosamente y enjuagado con agua destilada. Las muestras por analizar deben tener una concentración de proteínas conocida a fin de elegir el volumen durante la electroforesis, en general se emplean volúmenes pequeños (200 a 400 µL) volúmenes mayores no son recomendables.

Tabla 0311.1. Proporciones de reactivos expresadas en mililitros.

	5 %	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %	17.5 %	20 %
Solución de monómeros	4.97	7.4	9.9	12.27	14.75	17.2	19.7
Agua destilada	17.53	14.75	12.25	9.78	7.3	4.85	2.35
Solución amortiguadora Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Solución de SDS al 10 %	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
TEMED	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Solución de persulfato al 10 %	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Solución de persulfato al 10 %	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

La concentración total de proteínas de las muestras que se colocan en los geles deben ser: para las muestras puras (una proteína) alrededor de 10 a 15 µg y para mezclas complejas utilizar 150 a 250 µg. Las características de composición que reúne un gel para el análisis de una proteína en particular o una mezcla de ellas no pueden ser establecidas más que por el método de ensayo y error, de tal manera que es necesario probar geles a diferentes concentraciones hasta encontrar aquella que proporcione los mejores resultados.

En general, una concentración media de acrilamida con la que la mayoría de proteínas puras y mezclas de las mismas dan resultados de resolución aceptables es del 12.5 %. En la *tabla 0311.1* se dan las proporciones de reactivos expresadas en mililitros, que deben emplearse para obtener geles de las concentraciones más empleadas.

Si se desea preparar geles con concentraciones diferentes a las indicadas, basta hacer los cálculos para ajustar los volúmenes de la solución de monómeros (acrilamida + bis-acrilamida) y de agua destilada para obtener la concentración elegida, el resto de los reactivos no se altera en su proporción.

El equipo de electroforesis debe de armarse de acuerdo con las instrucciones de cada equipo en particular, después de ensamblado el equipo debe de colocarse sobre una superficie horizontal, antes de vaciar los reactivos que forman el gel, es conveniente probar las cámaras donde se construirá el gel, esto puede efectuarse con agua destilada para constatar que no existen fugas, una vez probada la hermeticidad de la cámara,

se elimina el agua destilada y el exceso se elimina con papel absorbente.

Antes de mezclar las soluciones para preparar el gel, debe permitirse que éstas alcancen la temperatura ambiente y una vez ocurrido, la mezcla se prepara en un matraz Kitasato, colocando primero: la solución de monómeros, agua destilada y la solución amortiguadora de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 en los volúmenes indicados en la *tabla 0311.1* y de acuerdo a la concentración del gel elegido. El matraz se tapa perfectamente y con la ayuda de una bomba de presión-vacío se le hace vacío para eliminar los gases disueltos que pueden producir burbujas durante la gelificación.

Aproximadamente de 15 a 20 min con agitación suave y ocasional son suficientes para eliminar gases, después de ese tiempo se agrega el resto de los reactivos indicados en la tabla y se mezclan suavemente, inmediatamente después se coloca dentro de la cámara para formar el gel.

El volumen que se prepara de la mezcla anterior dependerá del número de geles a preparar y del volumen que requiera cada cámara, y esto varía para cada equipo de electroforesis. La mezcla anterior es la que formará el gel de corrimiento y habitualmente este gel ocupa 4/5 partes del total del gel. Inmediatamente después de haber vaciado en la cámara del gel la mezcla de reactivos y antes de que gelifiquen, se coloca sobre la mezcla una "capa" de agua destilada de aproximadamente 1.0 cm de altura, la adición del agua puede hacerse con la ayuda de una pipeta Pasteur y con mucho cuidado para evitar que se mezclen las soluciones.

Si la adición del agua se realiza correctamente, se observará nítidamente una interfase entre la solución que formará el gel y el agua, el propósito de la capa de agua es que la superficie del gel quede plana. Si no se toma la precaución de colocar dicha capa de agua, la solución polimerizará dejando una superficie cóncava debido al menisco y si esto ocurre, las bandas de las proteínas por analizar al separarse tomarán esa forma.

Poco tiempo después de que se coloca la capa de agua, la interfase formada entre las dos soluciones desaparecerá y se debe a una ligera difusión de las soluciones en esa área pero cuando la polimerización del gel ha ocurrido completamente, nuevamente aparecerá la línea de interfase y ésta será la señal para continuar con la elaboración del gel.

La capa de agua destilada que se utilizó para lograr una superficie plana del gel de corrimiento se elimina invirtiendo la cámara del gel, y con la ayuda de un papel absorbente se quita cualquier remanente.

Para la preparación del gel espaciador se utiliza la siguiente mezcla de reactivos en las proporciones que se indican:

Solución de monómeros	5 mL
Agua destilada	17.5 mL
Solución. amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	7.5 mL
Solución de SDS al 10 %	0.3 %
TEMED	0.03 mL
Solución de persulfato al 10 %	0.15 mL

Al igual que en la preparación del gel de corrimiento, primero se mezclan, dentro de un matraz Kitasato; la solución de monómeros, el agua destilada y la solución amortiguadora, el matraz se tapa y se le hace vacío, con un poco de esta mezcla y antes de añadirle el resto de los reactivos, se enjuaga la cámara del gel, posteriormente, al resto de la mezcla se le adiciona los reactivos restantes, se mezclan y se vacían en la cámara donde ya se encuentra formado el gel de corrimiento.

Si se está formando el gel en placa, colocar el "peine" del equipo en su posición antes de que ocurra la gelificación, en caso de estarse utilizando tubos para los geles, cuidadosamente y sin mezclar coloque una capa de agua destilada sobre la mezcla de gel espaciador a fin de evitar que la superficie de este gel polimerice en forma convexa.

Una vez que se ha formado el gel espaciador es conveniente adicionarle un poco de la solución amortiguadora de corrimiento (Tris-Glicina-SDS pH 8.3) para evitar la desecación de los geles hasta su uso. Es común utilizar los geles varias horas (12 a 18 h) después de su preparación y esto es para asegurarse que la polimerización ha sido completa.

Antes de poner las muestras en los geles se les añade, 3 µL de la solución de azul de bromofenol, el cual funciona como marcador, ya que esta molécula, tiene una movilidad electroforética mayor que la mayoría de las proteínas.

Inmediatamente después de colocar todas las muestras y antes de que empiecen a difundir, se le hace pasar una corriente eléctrica, en el caso de geles en placa, 10 mA es la corriente adecuada durante el corrimiento en el gel espaciador, una vez que el azul

de bromofenol ha penetrado en el gel de corrimiento, la corriente eléctrica se incrementa a 25 mA y así se mantiene hasta que el colorante alcanza una distancia de 1 a 1.5 cm del borde del gel.

Para el caso de los geles en tubo, una corriente eléctrica de 2 mA por tubo para el corrimiento dentro del gel espaciador es la adecuada y de 3 mA por tubo para el corrimiento subsiguiente, al igual que para los geles en placa, se detiene el paso de corriente eléctrica cuando el colorante esté de 1 cm a 1.5 cm del borde del gel.

Una vez terminado el corrimiento electroforético los geles se sacan de la cámara para proceder a su fijación y tinción. Existen un gran número de colorantes y técnicas empleadas para visualizar las moléculas que han sido separadas en los geles, antes de realizar la tinción, las moléculas deben de fijarse al gel para evitar su difusión; la fijación puede hacerse como un paso independiente o incluir al fijador en la solución del colorante así que la fijación y la tinción se llevan al cabo simultáneamente.

La tinción más frecuentemente empleada para teñir proteínas en geles de poli(acrilamida) es con azul de coomassie (azul brillante), esta tinción ha sustituido a la de amido negro debido a su mayor sensibilidad, especialmente en la presencia de SDS. Los geles son fijados y teñidos sumergiéndolos durante 3 h en la siguiente solución previamente filtrada en papel filtro número 1.

Azul de Coomassie	1.25 g
Metanol absoluto	227 mL
Agua destilada	227 mL
Ácido acético glacial	45 mL

Después del tiempo requerido para la fijación y tinción, los geles se sumergen en una mezcla de metanol, agua destilada y ácido acético glacial en la misma proporción que la solución anterior.

Con cambios frecuentes de esta solución se elimina el exceso de colorantes y el tiempo requerido para ello es variable pero deberá tenerse cuidado de no excederse en los lavados, pues se corre el riesgo de que las bandas teñidas tenuemente puedan desaparecer.

ISOELECTROENFOQUE (IEF). Es un método de electroforesis que separa las proteínas según su punto isoelectrónico. La separación se realiza en un gel en placa de poli(acrilamida) o de agarosa que contiene una mezcla de electrolitos anfóteros (anfolitos). Cuando se someten a un campo eléctrico, los anfolitos migran en el gel creando un gradiente de pH. En algunos casos se utilizan geles que contienen un gradiente de pH inmovilizado, preparados incorporando ácidos y bases débiles en regiones específicas de la red del gel durante la preparación del mismo. Cuando las proteínas alcanzan la fracción del gel que tiene un pH que es igual a su punto isoelectrónico (pI), su carga se neutraliza y cesa su migración. Según la mezcla de anfolitos elegida, es posible crear los gradientes en diversos intervalos de pH.

Aspectos teóricos

Cuando una proteína está en la posición de su punto isoeléctrico, su carga neta es nula y no se puede mover en la matriz de gel por efecto del campo eléctrico. Sin embargo puede moverse de dicha posición por difusión. El gradiente de pH y el campo eléctrico fuerzan a una proteína a permanecer en la posición de su punto isoeléctrico, donde se concentra; este efecto de concentración se denomina "enfoco". El aumento del voltaje aplicado o la reducción de la cantidad de muestra tienen por efecto mejorar la resolución de las bandas. Sin embargo, el voltaje aplicado está limitado por el calor generado, que debe ser disipado. La utilización de geles delgados y un sistema eficaz de refrigeración de la placa, controlado por un recirculador termostático, evita que se quemé el gel a la vez que permite un enfoque fino. La resolución se estima determinando la diferencia mínima de pI (ΔpI), que es necesaria para separar 2 bandas vecinas:

$$\Delta pI = 3 \times \sqrt{\frac{D (dpH/dx)}{E (-d\mu/dpH)}}$$

Donde:

D = Coeficiente de difusión de la proteína.

dpH/dx = Gradiente de pH

E = Intensidad del campo eléctrico, en voltios por centímetro,

$-d\mu/dpH$ = Variación de la movilidad del soluto con el pH en la región próxima al pI.

Puesto que D y $-d\mu/dpH$ son propiedades intrínsecas de las proteínas y no pueden ser alteradas, se puede mejorar la resolución utilizando un intervalo más estrecho de pH y aumentando la intensidad del campo eléctrico.

La resolución entre las bandas de proteínas sobre un gel de IEF preparado con anfólitos vectores puede ser bastante buena. Se puede mejorar la resolución utilizando gradientes de pH inmovilizados en los que las especies amortiguadoras que son análogas a los anfólitos vectores, están copolimerizadas dentro de la matriz del gel. Las proteínas que presentan una diferencia de pI de sólo 0.02 unidades de pH se pueden resolver utilizando un gel preparado con anfólitos vectores, mientras que los gradientes de pH inmovilizados pueden resolver las proteínas que presentan una diferencia de pI de aproximadamente 0.001 unidades de pH.

Recomendaciones

Se debe prestar una especial atención a las características y/o preparación de la muestra. La presencia de sal en la muestra puede ser problemática y es mejor preparar la muestra, si es posible, en agua nivel 2 o en una disolución de anfólitos al 2 %, utilizando, si es necesario, diálisis o filtración en gel.

El tiempo requerido para completar el enfoque en geles de poli(acrilamida) se determina depositando una proteína coloreada (por ejemplo, hemoglobina) en diferentes posiciones sobre la superficie del gel y aplicando el campo eléctrico: el estado de equilibrio se alcanza cuando todas las

aplicaciones dan un perfil de bandas idéntico. En algunos protocolos, el punto final del enfoque se indica por el tiempo transcurrido desde la aplicación de la muestra.

El gel de IEF se puede utilizar como un ensayo de identidad cuando el perfil de migración sobre el gel se compara con el de una preparación patrón adecuada y con las proteínas de calibración del IEF. Dicho gel puede también utilizarse como una prueba límite cuando la densidad de una banda en IEF se compara subjetivamente con la densidad de las bandas que aparecen en una preparación patrón, o se puede utilizar como una prueba cuantitativa, a condición de ser validado, cuando se mide la densidad utilizando un densitómetro o instrumento similar para determinar la concentración relativa de cada banda.

ISOELECTROENFOQUE EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Procedimiento general: desmontar el molde y, utilizando la película de poliéster, transferir el gel al soporte enfriado, humedecido con unos mililitros del líquido indicado en la monografía, teniendo especial cuidado de evitar la formación de burbujas de aire. Preparar la muestra y las soluciones de referencia como se especifique en la monografía. Colocar sobre el gel tiras de papel para aplicación de las muestras, de aproximadamente 10 mm x 5 mm e impregnar cada una con la cantidad prescrita de la muestra y de la solución de referencia. Aplicar también la cantidad indicada de una solución de proteínas de puntos isoeléctricos conocidos como marcadores de pH para calibrar el gel. En algunos protocolos el gel tiene ranuras premoldeadas en las que se aplica la preparación de la muestra en lugar de utilizar tiras de papel impregnadas. Cortar 2 tiras de papel con la longitud del gel e impregnarlas con las soluciones de los electrolitos: solución ácida para el ánodo y alcalina para el cátodo. La composición de las soluciones anódica y catódica se indica en la monografía. Aplicar estas mechas de papel a cada lado del gel a varios milímetros del borde. Colocar la tapa de modo que los electrodos estén en contacto con las mechas (respetando los polos anódico y catódico). Proceder al isoelectroenfoco aplicando los parámetros eléctricos descritos en la monografía. Desconectar la corriente cuando se haya estabilizado la migración de la mezcla de las proteínas patrón. Utilizando pinzas, retirar las tiras de aplicación de la muestra y las 2 mechas unidas a los electrodos. Sumergir el gel en solución de fijación para isoelectroenfoco en gel de poli(acrilamida). Incubar con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 min. Vaciar la solución y añadir 200 mL de solución decolorante/desteñido. Incubar con agitación durante 1 h. Drenar el gel, añadir solución de colorante Coomassie. Incubar durante 30 min. Decolorar el gel por difusión pasiva con disolución de decoloración hasta que las bandas se observen claramente frente a un fondo claro. Localizar la posición e intensidad de las bandas en el electroferograma como se describe en la monografía.

Variaciones al procedimiento general

Cuando se hace referencia al método general de isoelectrofoque, se pueden hacer variaciones en la metodología o en el procedimiento, pero deben ser validadas. Estas incluyen:

- el uso de geles premoldeados comercialmente disponibles y de kits comerciales de coloración y decoloración,
- el uso de gradientes de pH inmovilizados,
- el uso de geles cilíndricos,
- el uso de geles de diferentes dimensiones, incluyendo los geles ultrafinos (0.2 mm),
- variaciones en el procedimiento de aplicación de la muestra, incluyendo diferentes volúmenes de la muestra o el empleo de máscaras o mechas de aplicación de la muestra de un material distinto al papel,
- el uso de condiciones de migración alternativas, incluyendo variaciones en el campo eléctrico dependiendo de las dimensiones del gel y del equipo, y el uso de tiempos de migración fijos en lugar de la interpretación subjetiva de la estabilidad de las bandas,
- la inclusión de una etapa de pre-enfoque,
- el uso de instrumentación automática,
- el uso de geles de agarosa;
- la adición de urea al gel de migración (una concentración 3 M es con frecuencia suficiente para mantener la proteína en disolución, pero se pueden utilizar concentraciones de hasta 8 M). Algunas proteínas precipitan en su punto isoeléctrico; en este caso, se incluye urea en la formulación del gel para mantener la proteína en disolución; si se utiliza urea, solamente se deben utilizar disoluciones recién preparadas para evitar la carbamilación de la proteína;
- el uso de métodos de coloración alternativos;
- la incorporación al gel de aditivos, tales como detergentes no iónicos (por ejemplo, octilglucósido) o detergentes zwitteriónicos y la adición de anfólitos a la muestra, para evitar la agregación o precipitación de las proteínas.

Validación de los procedimientos de isoelectrofoque

Los siguientes criterios se pueden utilizar para validar la separación:

- formación de un gradiente de pH estable de características deseadas, evaluadas por ejemplo utilizando marcadores de pH coloreados de puntos isoeléctricos conocidos,
- comparación con el isoelectroferograma suministrado con la sustancia química de referencia para la preparación a examinar,
- cualquier otro criterio de validación descrito en la monografía.

Puntos a considerar

Las muestras se pueden aplicar en cualquier zona del gel, pero para proteger las proteínas de los ambientes de pH extremo, las muestras no deben ser aplicadas cerca de cualquiera de los electrodos. Durante el desarrollo del método, el analista puede intentar aplicar la proteína en 3 posiciones del gel (es decir, en el centro y en ambos extremos); el comportamiento de una proteína depositada en extremos opuestos del gel puede no ser idéntico.

Un fenómeno conocido como deriva catódica, en el cual el gradiente de pH decae con el tiempo, puede surgir si el enfoque del gel dura demasiado tiempo. Aunque este fenómeno no es aún bien comprendido, la electroendósmosis y la absorción de dióxido de carbono pueden ser los factores que llevan a la deriva catódica. La deriva catódica se observa cuando la proteína focalizada migra hacia el extremo catódico del gel. Para resolver este problema se pueden utilizar gradientes de pH inmovilizados.

Es importante un enfriamiento eficaz (aproximadamente 4 °C) del lecho sobre el que reposa el gel durante el enfoque. Los campos eléctricos elevados utilizados durante el isoelectrofoque pueden llevar a un sobrecalentamiento y afectar la calidad del gel enfocado.

INMUNOELECTROFORESIS. Esta técnica combina la separación electroforética de los componentes antigénicos de una mezcla (generalmente de naturaleza proteica) en un soporte de gel de agarosa, y la visualización de alguno de estos antígenos mediante una reacción de inmunodifusión en gel con un antisuero (anticuerpo) específico.

En este tipo de gel los antígenos y anticuerpos difunden libremente formando arcos de precipitación en donde se alcanza una zona de equivalencia; cada banda o arco formado representa una reacción antígeno-anticuerpo específica.

En caso necesario, el pH de la solución amortiguadora de barbituratos pH 8.6 se ajusta con soluciones diluidas de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (por ejemplo 1 M o 0.1 M).

Las soluciones tanto de antígeno como de anticuerpo, deben ser ajustadas a 10 g/L en solución salina al 0.9 %.

La solución de azul de bromofenol se prepara al 0.01 % en solución salina al 0.9 %.

Preparar una solución de agarosa al 1 % en solución amortiguadora de barbituratos, disolviendo por calentamiento. Se puede adicionar solución de timerosal hasta una concentración final de 0.01 % como conservador. Dejar enfriar hasta aproximadamente 40 °C y aplicar aproximadamente 5 mL de solución de agarosa a laminillas de vidrio de 75 × 25 mm (portaobjetos de microscopio), permitir la gelificación a temperatura ambiente y guardar las laminillas en cámara húmeda hasta su utilización.

Al inicio de la técnica de separación, se debe perforar la cubierta de agarosa haciendo pocillos de aproximadamente 2 mm de diámetro, como se indica en la *figura 0311.1*, llenando cada pocillo con muestra problema, suero patrón y azul de bromofenol.

Tabla 0311.2. Soluciones.

- 1 Solución de timerosal al 1.0 % en solución amortiguadora de barbituratos.
- 2 Solución amortiguadora de barbituratos 0.05 M pH 8.6.
- 3 Solución de agarosa al 1 % en solución amortiguadora de barbituratos.
- 4 Mezcla de antígenos (muestra problema o suero patrón) [1 g/L].
- 5 Solución de antisuero [1 g/L].
- 6 Solución de azul de bromofenol al 0.5 %.

Colocar las laminillas cargadas en la cámara de electroforesis con las muestras del lado del cátodo, y adicionar la cantidad adecuada de solución amortiguadora de barbituratos a ambos lados de los electrodos que permita establecer el circuito electroforético.

Cerrar la cámara de electroforesis para evitar evaporación durante la corrida y aplicar un voltaje de corriente directa que permita establecer una corriente eléctrica entre 30 y 40 mA. El voltaje será suspendido cuando la solución de azul de bromofenol marque un frente de corrida de aproximadamente 4 cm.

Extraer la laminilla de la cámara de electroforesis y hacer un canal longitudinal en uno de sus costados, llenándolo con aproximadamente 100 μ L de solución de antisuero, y permitir la inmunodifusión y precipitación incubando en cámara húmeda a 20 °C durante 24 h.

Para la interpretación de los resultados, el componente principal de la muestra problema debe corresponder al componente principal del suero patrón. La muestra problema puede presentar pequeñas cantidades de otras proteínas.

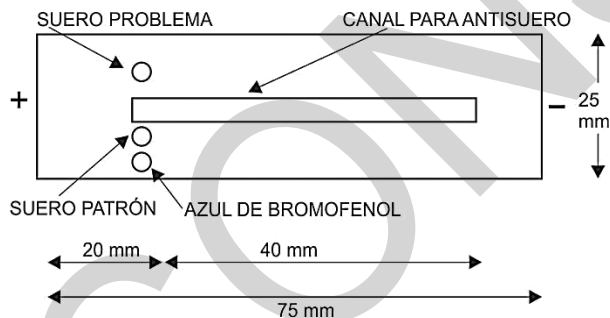


Figura 0311.1. Dimensiones de una laminilla para inmunoelectroforesis, sitios para la muestra y posición dentro de la cámara de electroforesis.