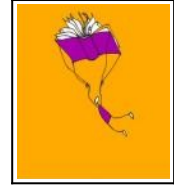


Separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa



1. OBJETIVO DE LA PRÁCTICA:

El objetivo de la práctica es realizar una aproximación al fundamento teórico de la electroforesis y conocer con los procedimientos implicados en la electroforesis en gel de agarosa para separar moléculas biológicas (en este caso, ADN)

2. INTRODUCCION

La electroforesis en gel de agarosa es un procedimiento analítico utilizado en varias áreas de la Biotecnología, tanto en laboratorios de investigación, como biomédicos y forenses. Es un **método de separación** frecuentemente utilizado para analizar fragmentos de ADN generados por enzimas de restricción, PCR, etc., y es un método analítico conveniente para determinar su tamaño en un rango de 500-30.000 pares de bases. También puede ser utilizado para separar otras biomoléculas como colorantes, ARN y proteínas.

El aparato de **electroforesis horizontal** es esencialmente una caja con electrodos en cada extremo, estos electrodos son de platino ya que tiene una conductividad eléctrica muy buena, debido a que los **electrodos de platino son caros y frágiles se debe tener cuidado cuando se manejan equipos de electroforesis.**

El medio de separación es un gel de **agarosa**, la agarosa es un polisacárido derivado del agar. El gel se realiza disolviendo la agarosa en un tampón llevado a punto de ebullición. La solución es luego enfriada aproximadamente a 55°C y se añade al molde para realizar el gel. Un **peine con pocillos** es colocado en el gel para que forme los pocillos donde se sembrarán las muestras.

Después que el gel ha solidificado, se coloca en la unidad de electroforesis y se sumerge con un tampón adecuado para llevar a cabo la electroforesis. La **unidad dispone de un electrodo positivo en un extremo y un electrodo negativo en el otro extremo.** Las muestras se preparan con un tampón de carga que contiene glicerol para darles densidad y de esta forma se mantienen en el pocillo sin salirse. Las muestra se siembra en los pocillos con una micropipeta.

Una fuente de corriente es conectada al aparato de electroforesis y se genera una corriente eléctrica. Las moléculas con una carga negativa migraran hacia el electrodo positivo (ánodo) mientras que las moléculas con una carga positiva migrarán al electrodo negativo (cátodo). El tampón sirve como conductor de la electricidad y controla el pH, lo cual es importante para la estabilidad de las moléculas biológicas. Como el **ADN tiene una carga negativa a pH neutro migrará a través del gel hacia el electrodo positivo durante la electroforesis.**

El **gel de agarosa contiene poros microscópicos que actúa como un tamiz** molecular separando las moléculas según su carga, forma y tamaño. Estas características junto con las condiciones del tampón, concentración del gel y voltaje, afectarán a la movilidad de las moléculas en el gel. La separación ocurre porque las moléculas más pequeñas pasan a través de los poros del gel más fácilmente que las de mayor tamaño. Si el ADN genómico es digerido por encimas de restricción varias veces, habrá un rango amplio de fragmentos que producirá un “smear” en el gel. Los fragmentos lineares de ADN migrarán más rápido a través del gel.

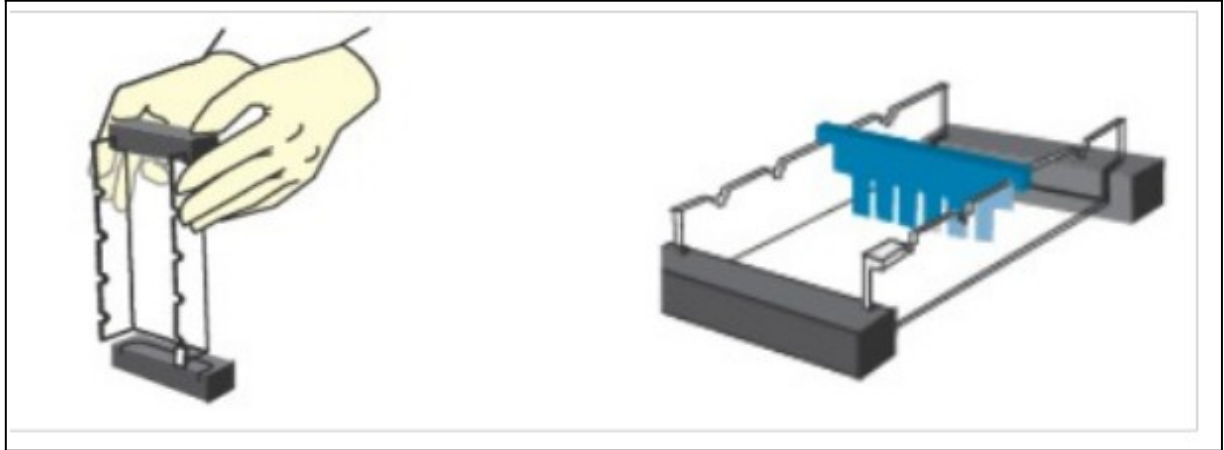
Para que las moléculas de ADN sean visibles en el gel de agarosa se requiere una tinción. En está práctica utilizaremos un **método NO TOXICO** que nos permitirá visualizar los fragmentos de ADN de color azul. Es necesaria una tinción posterior para la visulización de todas las banda obtenidas.

3. PRÁCTICA

3.1 PREPARACIÓN GEL DE AGAROSA

A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa. Después colocar el peine para formar los pocillos.



B) Preparación del gel de agarosa

- 1.b) Utilizar un vaso o erlenmeyer de 100 ml para preparar la solución del gel.
- 2.b) Para geles de 7 x 7 cm: Añadir 32 gr de Tampón de electroforesis 1 X más 0.30 gr de agarosa+ 80 *microlitros* DanaBlue 0.1 %, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.
- 3.b) Calentar la mezcla para disolver la agarosa,
- 4.b) Enfriar la solución de agarosa más o menos a 55°C
- 5.b) Añadir la solución de agarosa al molde
- 6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

C) Preparación del gel para la electroforesis

- 1.c) Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los topes.
- 2.c) Colocar el gel en la cámara de electroforesis correctamente orientada con los **pocillos más cerca del polo negativo (color negro)**.
- 3.c) Llenar la cámara de electroforesis con **300 ml de Tampón de electroforesis**
- 4.c) Asegurarse que el gel está completamente cubierto de tampón.
- 5.c) Sacar el peine que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.
- 6.c) Proceder a la siembra del gel y llevar a cabo la electroforesis.

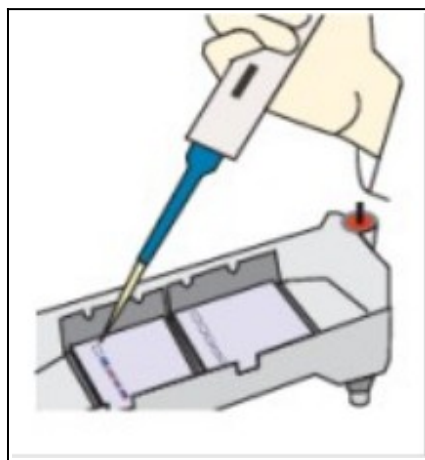
4.2 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

A) Muestras de electroforesis

1.a) Se suministran 4 muestras diferentes presentadas en 4 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra utilizando una micropipeta.

Pocillo	Muestra	Descripción
1	Verde	Marcador de peso molecular
2	Lila	ADN genómico
3	Rojo	ADN genómico
4	Azul	Marcador de peso molecular



B) Llevar a cabo la electroforesis

1.b) Después que se han sembrado las muestras, cuidadosamente colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos.

2.b) Insertar la clavija del cable negro en la entrada de color negro de la fuente de corriente (entrada negativa). Insertar la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente de corriente (entrada positiva)

3.b) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)** . Vigilar que los colorantes no salen fuera del gel.

4.b) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de las muestras.

5.b) Después de que la electroforesis ha terminado, apagar la fuente de corriente, desconectar los cables y sacar la cubierta.

6.b) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse). Para una correcta visualización de las bandas deberá pasarse al siguiente apartado que es la tinción del gel para visualizar todas las bandas correctamente.

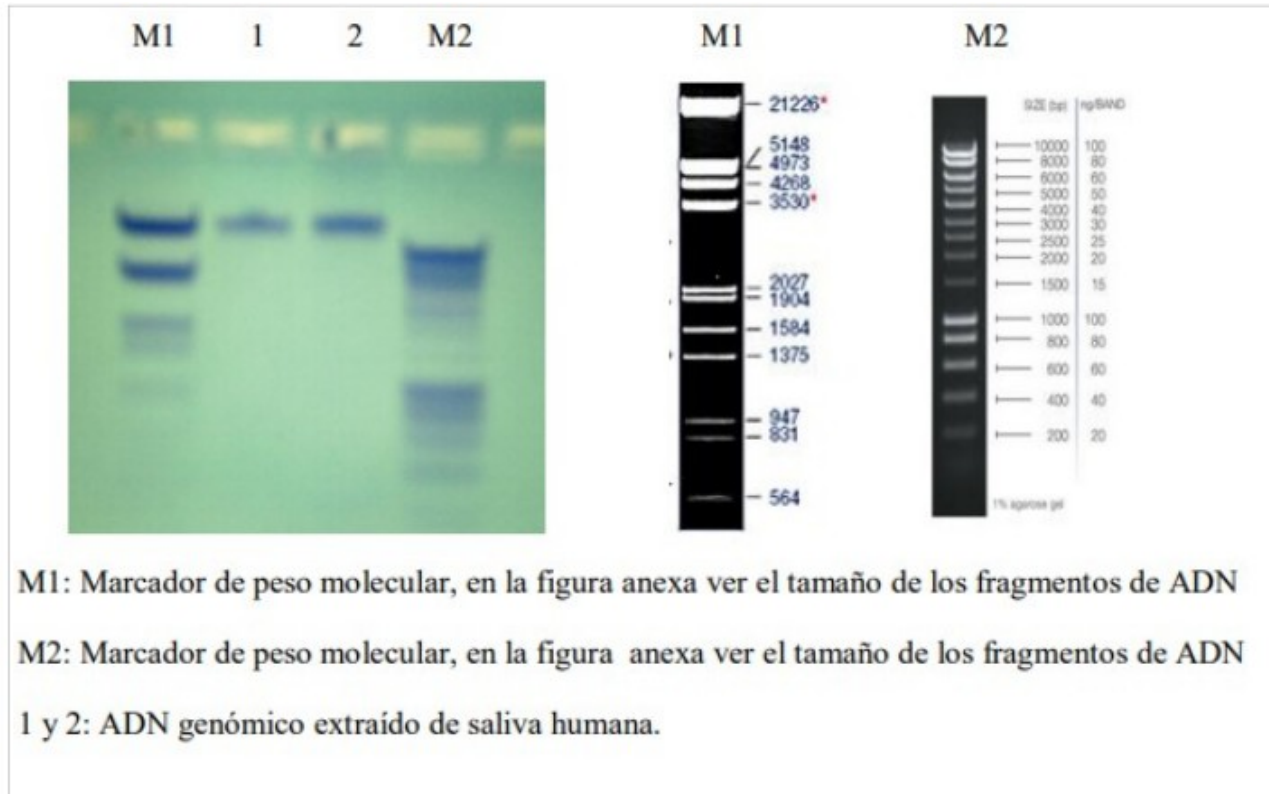
4.3 TINCIÓN DEL GEL DE AGAROSA

1. No teñir los geles en la cubeta de electroforesis.

2. Colocar el gel en un recipiente con 100 ml de FlashBlue 0.75X, de forma que quede completamente cubierto.

3. Incubar durante 10 minutos. Aumentar el tiempo de tinción conllevará a un mayor número de lavados con agua a posteriori para eliminar el exceso de colorante.

4. Colocar el recipiente con el gel debajo de un grifo de agua y dejar correr el agua hasta que no salga de color azul. Sujetar el gel para no perderlo. Llenar el recipiente con agua.
 5. Cuidadosamente sacar el gel del recipiente y examinar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, puede servir una hoja blanca). En este paso se apreciarán las bandas pero el gel tendrá un color azul muy intenso que no permitirá apreciar bien las bandas.
 6. Si es necesario realizar varios lavados con agua. Si todavía tiene un color muy intenso de fondo, es posible, dejarlo toda la noche en agua y a la mañana siguiente observar el gel.
5. RESULTADOS



6. PREGUNTAS

1. ¿Qué conclusión se puede sacar del experimento realizado?
2. ¿Qué es el ADN genómico?
3. ¿En base a qué factores se separan las moléculas en la electroforesis?
4. ¿Qué sucedería si se utilizará agua destilada en lugar del Tampón de electroforesis en la cámara de electroforesis o en la solución del gel de agarosa?
5. ¿El ADN hacia qué electrodo migrará?