

ELECTROFORESIS AVANZADA

Ref. ELECAVANZADA (4 prácticas)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los alumnos en el conocimiento de la teoría electroforética y familiarizarse con los procedimientos implicados en la electroforesis en gel de agarosa para separar moléculas biológicas.

En este caso se utilizarán fragmentos de ADN reales, marcadores de peso molecular donde se podrá observar como los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente por el gel de agarosa y ADN genómico que debido a su alto peso molecular migrará lentamente.

Se introducirá también en las técnicas de visualización de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa, para ello se utilizará un método desarrollado por BioTed y que no es tóxico a diferencia de los métodos tradicionales utilizados (bromuro de etidio).

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. De los tipos de electroforesis existentes, la electroforesis en gel de agarosa es el método más común y más utilizado. 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.

Existen diferentes tipos de electroforesis en gel de agarosa pero la electroforesis horizontal es el más utilizado para separar moléculas de ADN en agarosa. Otros tipos, como la electroforesis vertical, se utilizan para separar proteínas y utiliza geles de poliacrilamida.

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. Originario de las algas, la agarosa es altamente purificada para eliminar todas las impurezas. Se extrae de la misma alga que se utiliza para obtener el agar utilizado en microbiología y del utilizado en alimentación. Es una sustancia no tóxica pero no debe ser ingerido.

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 cargadas de la muestra entrarán en el gel a través de la pared del pocillo de siembra. 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.

Si la electroforesis se realiza con muestras de colorantes que simulen fragmentos de ADN, la migración de varias moléculas puede ser visualizada directamente en el gel durante la electroforesis y no requiere una tinción posterior del gel. No obstante, las moléculas pequeñas de colorante pueden ser susceptibles de difusión fuera del gel, de este modo se debe vigilar cuando se produce la separación completa de los colorantes.

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 tamaño de 2 fragmentos son similares o idénticos, migrarán juntos en el gel. Si el ADN genómico es digerido 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.

Dos moléculas con el mismo peso molecular y forma, migrará más rápido la que mayor carga tenga. Las moléculas que se unan más fuertemente a la agarosa migrarán más lentamente. La movilidad de las moléculas durante la electroforesis también se puede ver influenciada por la concentración del gel de agarosa, a mayor concentración de agarosa la electroforesis durará más.

Para que las moléculas de ADN sean visibles en el gel de agarosa se requiere una tinción ya que el ADN en sí no tiene color. El método más común de tinción para visualizar el ADN utiliza bromuro de etidio debido a su elevada sensibilidad. El bromuro de etidio es un mutágeno y debe ser manejado con mucho cuidado. También se necesita para la visualización una fuente de luz ultravioleta (transiluminador de UV). Actualmente existen otros colorantes, diferentes empresas han desarrollado diferentes tipos de colorantes para aumentar la sensibilidad y con un poder mutagénico muy inferior al bromuro de etidio.

En nuestro caso utilizaremos un método NO TOXICO que nos permitirá visualizar los fragmentos de ADN de color azul, se podrán observar durante el proceso electroforético pero será necesario una tinción posterior para poder observar todas las bandas.

3. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10X (2 envases 500ml)	2 x 50 ml
Agarosa	1.75 gr
Micropipeta 20 microlitros	1
Rack de puntas	1
Microtubos de muestras	4
DanaBlue 0.1 %	400 µl
FashBlue 0.75X	125 ml

Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

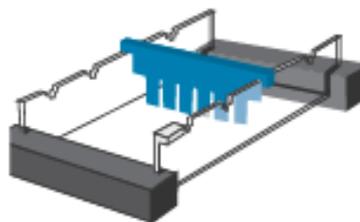
Para cualquier duda o consulta adicional, por favor , contacte con nosotros bioted@arrakis.es

4. PRACTICA

4.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los toques 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 µl DanaBlue 0.1 %**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

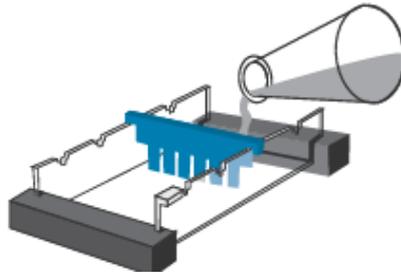
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir **42 gr de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.40 gr de agarosa** + **100 µl DanaBlue 0.1 %**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa

Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis 10 X

3.b) Calentar la mezcla para disolver la agarosa, el método más rápido es la utilización de un microondas, también puede utilizarse un placa calefactora, en ambos casos, para que la agarosa se disuelva se ha de llevar **la solución a punto de ebullición**. La solución final debe aparecer clara sin partículas aparentes.

4.b) **Enfriar** la solución de agarosa más o menos a 55°C (para acelerar el proceso se puede enfriar colocando el envase debajo de un grifo de agua y agitar). Si se produce mucha evaporación del líquido, añadir tampón de electroforesis.

5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.

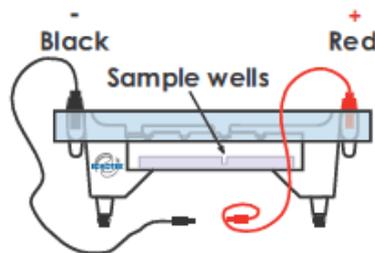


6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

C) Preparación del gel para la electroforesis

1.c) Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los topos.

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**. *El tampón de electroforesis se puede utilizar para 2 experimentos de electroforesis, una vez terminada la electroforesis guardar este tampón utilizado en un envase diferente al suministrado para utilizarlo en una nueva 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

Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

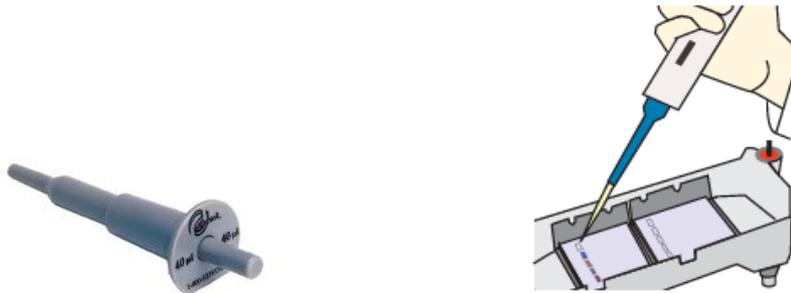
A) Muestras de electroforesis: *Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces pequeñas gotas de la muestra puede estar en las paredes de los microtubos. Asegurarse de que toda la cantidad de muestra se encuentra uniforme antes de sembrar el gel. Centrifugar brevemente los microtubos de muestra, o golpear los microtubos contra una mesa para obtener toda la muestra en la parte inferior del microtubo.*

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:

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

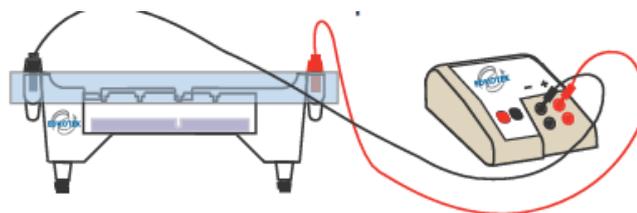
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



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).



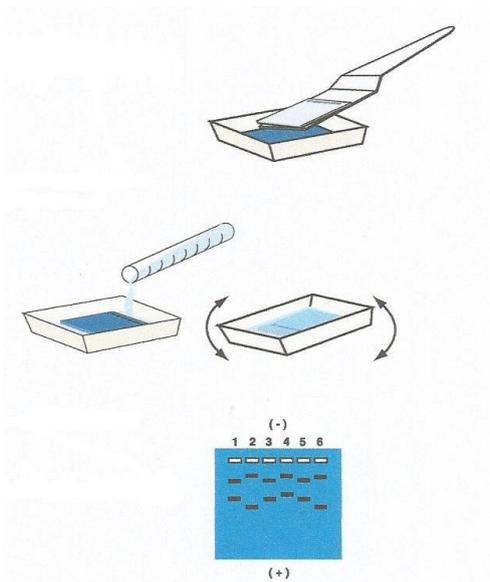
3.b) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)** . **Vigilar que los colorantes no salen fuera del gel.**

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.

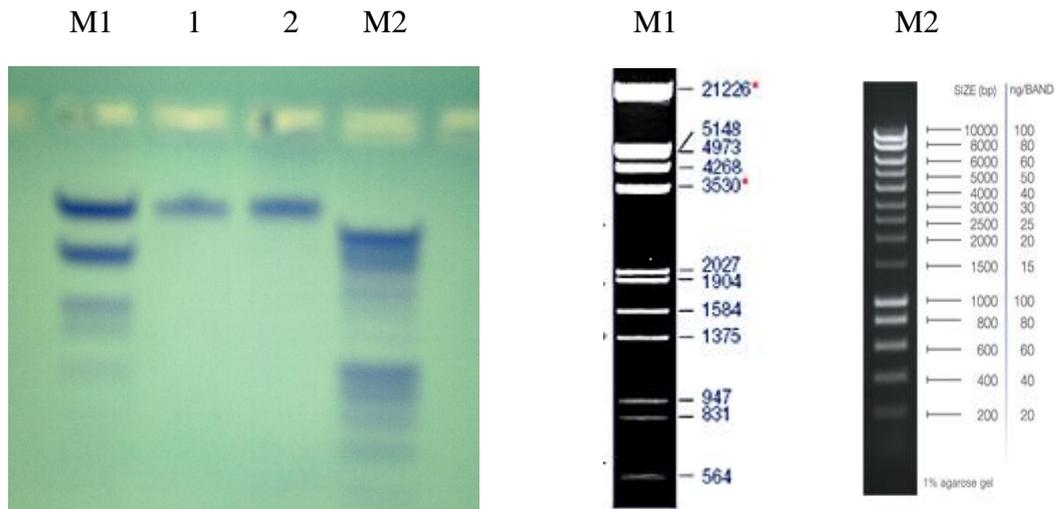
6.b) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse). Para una correcta visualización de las bandas deberá pasarse al siguiente apartado que es la tinción del gel para visualizar todas las bandas correctamente.

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. Guardar los 100 ml de FlashBlue 0.75 X para otras tinciones.
5. 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.
6. 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.
7. Realizar varios lavados con agua en agitación si es posible. Se observará como cada vez se hacen más visibles las bandas y desciende el color azul de fondo.
8. 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



M1: Marcador de peso molecular, en la figura anexa ver el tamaño de los fragmentos de ADN

M2: Marcador de peso molecular, en la figura anexa ver el tamaño de los fragmentos de ADN

1 y 2: ADN genómico extraído de saliva humana.

6. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRACTICA

Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

1. **¿Qué conclusión se puede sacar del experimento realizado?** Que el ADN genómico tiene un tamaño de 20-25 Kb (25.000 pares de base) comparando a que altura se encuentra respecto a los marcadores de peso molecular. Que el ADN genómico se encuentra intacto, ya que aparece como una banda única intacta, si estuviera degradado se vería un “smear” todo ese pocillo hasta abajo se vería de color azul.
2. **¿Qué es el ADN genómico?** Es el ADN que se encuentra en el interior de nuestros cromosomas y es donde está toda la información.
3. **¿En base a qué la electroforesis de agarosa separa moléculas?** La electroforesis separa las moléculas en base a su tamaño, carga y forma.
4. **Explicar la migración de acuerdo con la carga.** Las moléculas que tienen una carga negativa migrarán hacia el polo positivo; mientras que las moléculas cargadas positivamente migrarán hacia el polo negativo.
5. **¿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?** Como el agua destilada no contiene iones esto reducirá la conductividad del fluido y la movilidad de las moléculas a migrar en el gel. El tampón sirve como conductor de la electricidad y controla el pH, lo cual es importante para la estabilidad de las moléculas biológicas.
6. **¿El ADN hacia qué electrodo migrará?** Como el ADN tiene una carga negativa a pH neutro migrará a través del gel hacia el electrodo positivo durante la electroforesis.