

ELECTROFORESIS BÁSICA

Ref. ELEC BASICA (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 colorantes que simularán fragmentos de ADN haciendo más vistoso el gel.

2. INTRODUCCION

La electroforesis en gel de agarosa es un procedimiento utilizado en varias áreas de la Biotecnología, es un procedimiento analítico utilizado en laboratorios de investigación, 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 utilizada 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, el gel 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 migrarán 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 lineales 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.

3. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10 X (2 envases 500ml)	2 x 50 ml
Agarosa	1.75 gr
Micropipeta 20 microlitros	1
Rack de puntas	1
Microtubos de muestras	7

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.

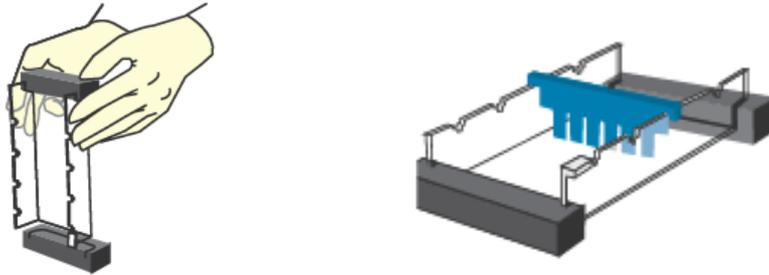
Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros bioted@arrakis.es

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**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

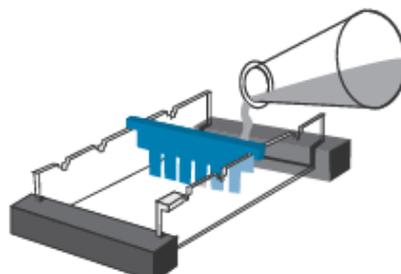
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir **42 gr de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.40 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

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.

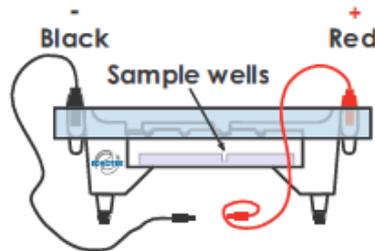
5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.



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 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**. *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

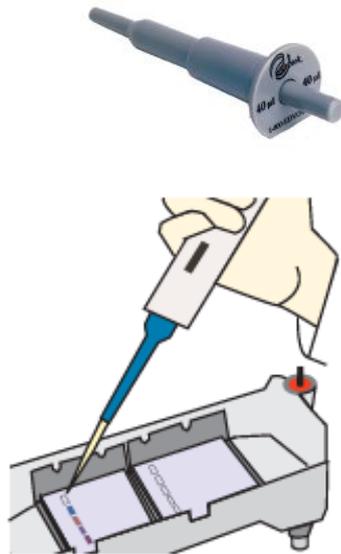
Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

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.*

- 1.a) Se suministran 7 muestras diferentes presentadas en 7 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

Pocillo	Muestra
1	Verde
2	Negro
3	Lila
4	Blanco
5	Amarillo
6	Rojo
7	Azul

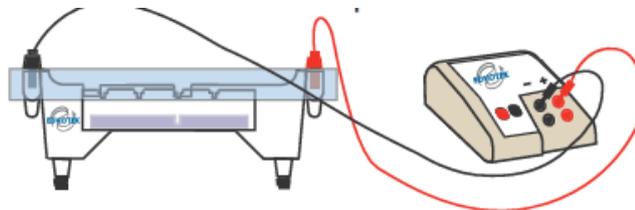
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



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 los colorantes.

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).

5. RESULTADOS

1 2 3 4 5 6 7



1. Las moléculas cargadas viajarán a través de la electroforesis según su carga y tamaño. Mientras que la forma es importante en el caso de biomoléculas (ADN y proteínas), en el caso de los colorantes no es un factor a tener en cuenta.
2. Una mezcla de colorantes, fragmentos de ADN o proteínas puede ser separada en una electroforesis (pocillos 1-2-3-4).
3. Todos los colorantes utilizados tienen una carga negativa.
4. El color no afecta a la movilidad. El color que se observa en el gel es el color real del colorante.

6. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

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

1. **¿En base a qué la electroforesis de agarosa separa moléculas?** La electroforesis separa las moléculas en base a su tamaño, carga y forma.
2. **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.
3. **¿Qué conclusión se puede sacar del experimento realizado?** Todos los colorantes tienen carga negativa. La electroforesis es capaz de separar la mezcla de colorantes según su carga. El color observado en el gel es el real del colorante.
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?** 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.
5. **¿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.