

Electroforesis en gel de agarosa

Juan Camilo Arboleda Rivera

2024-02-25

1 Introducción

Hoy en día es posible separar regiones determinadas de ADN, obtenerlas en cantidades prácticamente ilimitadas y determinar su secuencia de nucleótidos a una gran velocidad. Mediante variaciones sobre estas mismas técnicas, un gen puede ser alterado y ser transferido a células en cultivo o a la línea germinal de animales, donde el gen modificado se incorpora como parte funcional y permanente del genoma. Una de las técnicas que ha hecho posible esto es la cromatografía con una de sus más grandes variantes como lo es la electroforesis.

La electroforesis es la migración de compuestos con carga eléctrica bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el polo positivo o el negativo, dependiendo de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas (Alberts 2015; Lodish 2016).

La electroforesis se realiza en cámaras que pueden ser verticales y horizontales y requieren de dos elementos indispensables: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. La fase estacionaria o soporte, es un polímero gelatinoso con un tamaño de poro homogéneo que está sumergido en la fase móvil. El polímero utilizado para el análisis electroforético de ácidos nucleicos de gran tamaño (100pb-10kb) es la agarosa (Alberts 2015; Lodish 2016).

Para el caso de fragmentos menores de 500 nucleótidos de largo, existen geles de poliacrilamida especialmente diseñados que permiten la separación de moléculas que se diferencien en un solo nucleótido de longitud. Los poros de los geles de poliacrilamida son demasiado pequeños para permitir que moléculas largas de ADN puedan atravesarlo. Para separar estas moléculas en función de su tamaño, se utilizan geles con poros más grandes, formados por soluciones diluidas de Agarosa (Alberts 2015; Lodish 2016; Green, Sambrook, y Sambrook 2012).

La migración de los fragmentos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) en un gel de

agarosa sometido a un campo eléctrico depende tanto del voltaje del campo, como del tamaño de poro del gel de agarosa. La separación efectiva de los fragmentos de ADN o ARN (resolución) depende tanto del tamaño como de la carga de los distintos fragmentos, en realidad de la relación carga/tamaño. En los geles de Agarosa o Poliacrilamida las bandas de ADN serán invisibles a menos que se marque o se tiña de alguna manera. Transcurrida la electroforesis, la localización relativa de los fragmentos se determina mediante distintos métodos de detección. La tinción con bromuro de etidio, una sonda fluorescente tras iluminación con luz UV, es un método generalizado de detección de fragmentos de ADN, ya que la sonda se intercala entre su doble hélice y emite luz. Un método de detección más sensible que éste, consiste en la incorporación de un radioisótopo a la molécula de ADN antes de la electroforesis, habitualmente, se utiliza el ^{32}P ya que puede ser incorporado en los fosfatos del ADN y emite partículas β muy energéticas que son fáciles de detectar por autorradiografía (Alberts 2015; Lodish 2016).

La técnica más comúnmente utilizada para la separación del ADN es la electroforesis horizontal entre 0.5% a 6% de Agarosa, usualmente sumergida en uno o dos Buffers de corrido (TAE, TBE o TBX). La concentración de agarosa depende del tamaño de los fragmentos a ser separados. Generalmente, concentraciones altas de agarosa (mayor de 4%), podrían ser usadas solo cuando se van a separar fragmentos de ADN pequeño (<100pb) (Green, Sambrook, y Sambrook 2012; Westermeier y Gronau 2005).

Dentro del campo electroforético, existen dos polos: el polo positivo y el polo negativo, dentro de los cuales se encuentran el ánodo y el cátodo respectivamente. Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. La naturaleza del enlace fosfodiéster de las cadenas polinucleotídicas condiciona la carga de un ácido nucleico, que es aproximadamente igual al número de grupos fosfato lo que provocará su migración hacia el ánodo (Alberts 2015; Lodish 2016).

Actualmente, la técnica de la electroforesis posee algunas variantes que ayudan en la separación de biomoléculas (ADN, ARN, proteínas) dependiendo de las necesidades de las investigaciones científicas como la electroforesis 2D, el iso-electroenfoque (IEF), isotacoforesis, entre otras (Lodish 2016; Westermeier y Gronau 2005).

1.1 Soluciones Tampón (buffer)

Durante la electroforesis el agua es electrolizada, lo cual genera protones hacia el ánodo, e hidroxilos al cátodo. El extremo catódico de la cámara de electroforesis se vuelve básico, y el extremo del ánodo es ácido. Por lo tanto, se requiere el uso de soluciones Buffer para asegurar moléculas cargadas. Las soluciones tampón (Buffer en inglés) más usadas comúnmente para la electroforesis de ADN son el Tris-Acetato con EDTA pH 8.0 (TAE: Tris- acetato 40mM, EDTA 2mM) y Tris-Borato con EDTA pH 8.0 (TBE: Tris-Borato 89mM, EDTA 1mM).

A pesar de ser similares, cada buffer tiene propiedades particulares las cuales se

usan para situaciones y necesidades diferentes. Se utiliza cualquiera de los dos cuando no interesa recuperar el ADN y cuando éste tiene menos de 12kb-15kb. El TBE es útil cuando el ADN tiene menos de 1kb; mientras que para ADN mayor de 12 a 15kb, se utiliza el TAE y también cuando se desea purificar el ADN (Green, Sambrook, y Sambrook 2012; Westermeier y Gronau 2005).

2 Objetivos

2.1 Competencias actitudinales

- Comprender los principios de la electroforesis horizontal y cómo permiten la separación de moléculas de ADN y ARN.

2.2 Competencias procedimentales

- Realizar un gel de agarosa para electroforesis horizontal con el fin de visualizar moléculas de ADN y ARN.
- Visualizar el ADN separado utilizando el colorante Bromuro de Etidio (BrEt) mediante la exposición del gel a la luz UV.
- Visualizar moléculas de ARN extraídas de material biológico y verificar su integridad.

3 Materiales

- Fuente de poder
- Plato de Calentamiento o Parrilla Eléctrica
- Guantes Quirúrgicos (Estudiantes)
- Toallas de Papel
- Cámara de Electrofóresis para Minigeles
- Transiluminador de luz Ultravioleta
- Viales de 1.5 ml
- Vortex
- Marcadores Indelebles de Punta Fina (Estudiantes)
- Micropipeta de 20 μ L
- Caja Pequeña de Therazaki

4 Reactivos

- Agarosa de punto de fusión normal.
- Buffer TBE 10X.
- Solución Stock de Bromuro de Etidio, 10mg/ml.
- ADN Genómico Humano.
- ARN aislado de material vegetal
- Marcador de Peso Molecular 1000pb.

- Buffer de Carga (Azul de Bromofenol, Glicerol, Silencianol y Formamida).
- Agua Destilada.

5 Procedimiento

En esta práctica de laboratorio, la electroforesis se llevará a cabo en una cámara horizontal, a temperatura ambiente, usando buffer TBE pH 8.3 como buffer de corrido, entre 70-100 voltios. Se dejará correr aproximadamente 30 minutos. Para visualizar el ADN, el gel se teñirá con Bromuro de Etidio (concentración final = 0.5 µg/ml) y se observará en un transiluminador UV. Como alternativa de tinción, se puede utilizar una solución al 0.02% de Azul de Metileno. Este tiene como ventaja la no manipulación de sustancias carcinogénicas como el Bromuro de Etidio.

5.1 Preparación de las muestras

En una caja de Therazaki adicionar 2 µl de buffer de carga en tantos pozos como muestras tenga (con la misma punta), más uno adicional para el marcador de peso molecular. Adicionar y mezclar en cada uno de estos pozos 5 µl de cada muestra de ADN, utilizando puntas distintas para cada una. Preparar de la misma manera el ADN que se utilizará como marcador de peso molecular. Servir en el gel y dejar correr entre 30 minutos.

5.2 Preparación del gel de agarosa, siembra y electroforesis de las muestras

1. Armar la cámara electroforética.
2. Diluir la agarosa en buffer TBE 1X.
3. Calentar el recipiente, con la tapa floja, en el horno microondas o en estufa, hasta que la solución hierva.
4. Dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 50°C.
5. Agregar el bromuro de etidio para que quede a una concentración final de 0.5 µg/ml.

El bromuro de etidio es altamente mutagénico, carcinogénico y moderadamente tóxico. Use guantes cuando trabaje con soluciones que contienen este colorante y use máscara cuando trabaje con el reactivo puro.

6. Servir la solución de agarosa en la bandeja cuando su temperatura sea más o menos 45°C. Evite los vapores de bromuro de etidio producidos al servir caliente la solución de agarosa.
7. Eliminar todas las burbujas.
8. Colocar los peines adecuados.
9. Dejar polimerizar la agarosa, durante 10 a 15 minutos aproximadamente.
10. Colocar el molde con el gel en la cubeta de electroforesis.
11. Cubrir el gel con buffer TBE 1X.

12. Retirar los peines cuidadosamente para que los pozos queden bien formados. Nota: Para sacar la peineta, conviene agregar previamente buffer TBE 1X en la zona de los pozos para soltarla mejor.
13. Sembrar las muestras correspondientes (con cuidado de no romper el gel y evitar que se salgan del pozo).
14. Conectar la cámara a la fuente de poder con las siguientes especificaciones: 30 minutos, ~80 voltios, 25mA. Nota: Para evitar que las muestras se difundan en el gel, deben servirse y correrse lo más rápido posible.
15. Con guantes llevar el gel hasta el transiluminador de luz ultravioleta, apagar la luz y observarlo.

La luz ultravioleta es un agente mutagénico peligroso para la piel y ojos. Debe reducirse el tiempo de exposición al mínimo y usar máscara para proteger cara y ojos.

6 Trabajo del estudiante

Antes de iniciar la práctica cada estudiante debe entregar un diagrama de flujo describiendo el procedimiento que se realizará.

7 Referencias

- Alberts, Bruce. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Green, Michael R., Joseph Sambrook, y Joseph Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Lodish, Harvey F. 2016. *Molecular Cell Biology*. Eighth edition. New York: W.H. Freeman-Macmillan Learning.
- Westermeier, Reiner, y Sonja Gronau. 2005. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. 4th rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH.