Electroforesis de

ácidos nucleicos

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Elaboró: | Revisó: | Autorizó: |
| Nombre: | Dr. Oscar Medina Contreras | Dr. Oscar Medina Contreras | Dra. Jenny Vilchis Gil |
| Firma: |  |  |  |
| Fecha: | 2020-04-08 | 2020-04-08 | 2020-05-01 |

1. **Propósito**

Separar las moléculas de ADN de acuerdo con su peso molecular a través de geles de agarosa.

1. **Alcance**

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que necesiten separar moléculas de ADN a través de geles de agarosa en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez.

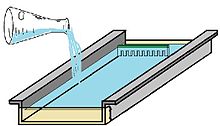
1. **Políticas de operación, normas y lineamientos**

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento.

Los residuos de tipo CRETI (Corrosivas, Reactivas, Explosivas, Toxicas e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT-2005.

1. **Descripción del Protocolo**

* Determinar el porcentaje de gel a preparar en base al tamaño de la molécula de ADN a analizar (Tabla 1).
* Pesar la cantidad de agarosa UltraPure de Invitrogen requerida para la resolución deseada.
* Disolver en 100ml de TAE 1X. Agitar.
* Calentar la agarosa hasta que se disuelva por completo. Agregar 4µl de SYBR Safe 10,000X de Invitrogen.
* Sellar completamente la cama para preparación de geles de agarosa con cinta adhesiva y posteriormente vaciar la agarosa en la cama.



Ánodo

Cátodo

* Colocar el peine y dejar que solidifique la agarosa. Una vez solidificado retirar la cinta adhesiva y el peine y colocar la cama dentro de la cámara de electroforesis.
* Agregar 200ml de TAE 1X (cubrir entre 0.5 o 1 cm por encima del gel).
* Mezclar las muestras de interés con buffer de carga 6X DNA Loading Dye y colocar en cada pocillo cada una de las muestras.
* Colocar el marcador de peso molecular (marcador de peso molecular + buffer de carga 6X DNA Loading Dye) en un pocillo.
* Cerrar la cámara de electroforesis y conectar a la fuente de poder.
* Encender la fuente de poder, seleccionar voltaje constante de 100V y migrar durante 20 minutos.
* Analizar el gel en el fotodocumentador utilizando el programa SYBR Safe.

**Notas**:

Asegúrese de que no queden burbujas atrapadas debajo de los peines y de ser así, eliminar antes de correr el gel.

Permitir al polvo de la agarosa hidratarse en la solución durante unos minutos antes de calentar: esto permite una disolución más sencilla, rápida y reduce la formación de espuma.

Para prevenir el sobrecalentamiento de la agarosa, si se usa un microondas sacar el vaso de precipitados después de 1 minuto y mover cuidadosamente. Volver a colocar dentro del microondas y continuar 1 minuto más. Si se hierve demasiado tiempo puede causar hidrólisis y una fuerza de resolución del gel menor.

1. **Diagrama de Flujo**
2. **Documentos de Referencia**

**Gründemann D., Schömig E.** 1996. Protection of DNA During Preparative Agarose Gel Electrophoresis Against Damage Induced by Ultraviolet Light. *Research Reports*, 21(5):898-903. Current Protocols in Molecular Biology, Appendix 2, A.2.5, Supplement 40, **Frederick M. Ausubel et al. 2003.**

1. **Anexos**

**Tamaño de ADN y porcentaje de gel**

|  |  |
| --- | --- |
| Tamaño (kb) | Concentración |
| >2 | 0.6% |
| 1-2 | 0.8% |
| 0.5-1 | 1% |
| 0.2-0.5 | 1.5% |
| <0.2 | 2% |

**Reactivos y Soluciones**

UltraPure Agarose de Invitrogen

SYBR SAFE

Buffer carga 6X DNA Loading Dye

Marcador de peso molecular

TAE 1X

**Preparación de TAE**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 1X | 50X |
| Tris | 40mM | 242g |
| Ácido Acético | 20mM | 57.1ml |
| Na₂EDTA-2H₂O | 1mM | 18.61g |
| H₂Od (aforar a) |  | 1L |