

1. Título práctica de laboratorio:

DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General:

- Comprender el fundamento de la separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa.

Específicos:

- Entender los principios físico-químicos de la separación de moléculas de ADN por electroforesis.
- Conocer y utilizar equipos y reactivos básicos empleados en Biología Molecular.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

La electroforesis es un procedimiento que aprovecha la migración de las moléculas cargadas eléctricamente (como el ADN, ARN y proteínas) cuando se le somete a un campo eléctrico, para separarlas en función de su tamaño, carga y forma. En la electroforesis, una alícuota de ácidos nucleicos se incluye en un gel, generalmente compuesto de agarosa o de poliacrilamida, que forman una red compleja de fibrillas que actúan como "tamices" moleculares permitiendo que las moléculas pequeñas migren más rápido que las grandes, así mismo las moléculas de forma compacta migrarán más rápido que las moléculas de forma alargada. El tamaño de los poros entre fibrillas puede controlarse de acuerdo a la concentración a la que este se prepare la acrilamida o la agarosa, por ello antes de la electroforesis se debe tener una idea del tamaño de la molécula a separar¹.

Durante el tiempo de migración del ADN, el gel se mantiene sumergido dentro de una cubeta de electroforesis con un tampón que proporcione la conductancia eléctrica apropiada (determinada por su fuerza iónica); a su vez la cubeta se conecta a una fuente de corriente continua con un voltaje determinado, favoreciendo que los ácidos nucleicos sean atraídos y migren hacia el polo positivo (generalmente identificado por el color rojo), por ello las muestras deben cargarse en el polo negativo

(identificado por el color negro)^{1,2}.

Finalmente, la movilidad de las moléculas en el gel dependerá de factores intrínsecos de la molécula como su carga, tamaño y forma, así como aspectos extrínsecos tales como las características del tampón de electroforesis (conductividad, temperatura, pH), la concentración del gel y la potencia eléctrica.

Al terminar el tiempo de migración, el gel se observa en un transiluminador de ultravioleta, gracias a que a la muestra de ADN se le adiciona, previa a la electroforesis, una solución que se adhiere o se intercala entre las bases del ácido nucleico para que, después de un tiempo definido de migración, la ubicación de las moléculas de ADN en el gel sea observable al fluorescer o brillar con la iluminación de la luz ultravioleta^{2,3}.

4. CONSULTA PREVIA

- 4.1. ¿Qué características físicas tienen los ácidos nucleicos para que puedan migrar en un campo eléctrico? Indique qué función tienen los tampones para electroforesis y su relación con las características físicas de los ácidos nucleicos.
- 4.2. Observe el siguiente video: <https://www.youtube.com/watch?v=wXiiTW3pflM> De acuerdo a lo observado en el video, indique la relación entre la concentración del gel de agarosa y el tamaño de los ácidos nucleicos. Además, indique el rango de la concentración de agarosa a la que se pueden correr fragmentos de ADN de: 150 pb, 730 pb, 1600 pb, 7000 pb y fragmentos de más de 10.000 pb.
- 4.3. ¿Qué tipos de compuestos se suelen utilizar para visualizar los ácidos nucleicos en el gel de agarosa? Indique las ventajas y desventajas de estos tipos de compuestos.
- 4.4. Observe el siguiente video: https://www.youtube.com/watch?v=U2-5ukpKg_Q De acuerdo a lo observado en el video, indique al menos 5 cosas que se deben evitar al realizar una electroforesis y porque se deben evitar.
- 4.5. ¿Para qué sirve el tampón de carga? ¿Qué reactivos suelen tener los tampones de carga?
- 4.6. ¿Qué es un marcador de peso molecular? ¿Para qué sirve?
- 4.7. ¿Qué tipo de protección se debe usar cuando se expone a la luz ultravioleta?

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos	Reactivos
PARA TODO EL GRUPO	Para el tampón de electroforesis:
1 caja de puntas para micropipeta de 0.5 /10 µL	

• 1 caja de puntas para micropipeta de 5 - 50 μL • 1 matraz de 50 mL • 1 balón aforado de 500 mL • 1 vidrio de reloj • 20 cm de papel aluminio • 1 cubeta de electroforesis con molde y peines • 1 fuente de poder • 1 horno microondas • 1 probeta de 50 mL • Micropipetas de 0.5 - 10 μL • Micropipetas de 5 - 50 μL PARA CADA GRUPO DE TRABAJO • 8 tubos eppendorf de 1.5 mL • 1 gradilla para tubos eppendorf de 1.5 mL	• 10 mL de buffer TBE 10X • 50 mL de agua destilada Para el gel: • 0.5 g de agarosa • 250 mL de buffer TBE1X • 2 μL de Hydragreen • 2 μL de marcador de peso molecular Para cada muestra: • 10 μL de dilución de ADN • 3 μL tampón de carga por muestra.
---	---

Materiales que debe traer el estudiante

- Papel absorbente: al menos 5 hojas.
- Marcador para plástico o vidrio
- Elementos de bioprotección (gafas, cofia, tapabocas, guantes, bata, zapatos cerrados)

6. PROCEDIMIENTO

Para el desarrollo de esta práctica, tenga en cuenta las siguientes instrucciones⁴:

- Para todos los grupos se preparará una única solución de buffer para la corrida electroforética (500 ml de TBE 1X).
- Para todos los grupos se preparará un único gel de agarosa.
- El control de peso molecular está listo para usar. Ponga en el pozo correspondiente entre 1 y 3 μ L.
- Cada grupo preparará sus muestras de ADN y las cargará en el gel de agarosa para la electroforesis (como se explica en el apartado 6.3).

6.1. Preparación del buffer para la corrida electroforética

- Prepare 500ml de TBE (Tris-Borate-EDTA) 1X, a partir de una solución de TBE 10X.

6.2. Preparación del gel de electroforesis

- Prepare 30 ml de gel de agarosa al 1% w/v usando como solución el buffer TBE 1X, para esto añada el polvo de agarosa a la solución, y caliente en horno microondas (o estufa) por 40 segundos; agite suavemente, y nuevamente caliente por 20 segundos. Repita este último paso hasta que la solución quede translúcida.

- Deje enfriar por 5 minutos agitando suavemente sin formar burbujas.
- Aliste la cámara de electroforesis con los pozos.
- Adicione 1.5 μL del marcador fluorescente Hydragreen a los 30 ml de solución de agarosa al 1% preparada, mezcla suavemente y sirva en la cámara.
- Permita la polimerización de la agarosa por 15 minutos. (Si no va a correr el gel en las próximas 2 horas protéjelo de la luz).
- Retire el peine de los pozos con cuidado de no romper el gel de agarosa.

6.3. Preparación de las muestras de ADN.

En un microtubo de 1.5 mL, coloque 3 μL de tampón de carga 1X y adicione una alícuota de 10 μL de ADN. Realice el mismo procedimiento para cada muestra a analizar.

6.4. Carga del gel.

- Coloque el molde con el gel de agarosa en la cámara de electroforesis, ubicando los pozos hacia el polo negativo.
- Llene la cámara con el buffer TBE 1X hasta cubrir completamente el gel y sin sobrepasar los límites demarcados en la cámara.
- Ubique el trozo de papel aluminio o un papel oscuro fuera de la cámara debajo de los pozos para poderlos observar.
- Inicie poniendo en el primer pozo de izquierda a derecha la muestra con el control de peso molecular. En los siguientes pozos ponga cada una de las muestras a evaluar, teniendo en cuenta la posición de cada muestra y precaución al ubicar la muestra en solo un pozo, sin contaminar los siguientes.
- Si desea vuelva a poner en el último pozo otra alícuota del control de peso molecular.

6.5. Corrida del gel.

- Tape la cámara haciendo coincidir los polos.
- Conecte la cámara de electroforesis a la fuente de poder.
- Programe la corrida a 100 voltios por 35 minutos.
- Evalúe que el frente de corrido este mínimo a 1cm del extremo inferior del gel, sino es así deje correr unos minutos más.
- Desconecte la cámara de electroforesis y ponga el gel en un transiluminador UV (Recuerde usar protección para el uso de radiación UV) para evaluar la presencia de DNA.

Manejo de residuos: adicionar, en caso necesario, agua en la solución concentrada hasta diluir la concentración del intercalante de bases a 0,5 mg/ml. En seguida adicionar KMnO_4 0,5 M equivalente

a 1 volumen de la solución que será descontaminada. Mezclar cuidadosamente y, en seguida, agregar 1 volumen de HCl 2,5 M. Mezclar nuevamente y dejar reposando por varias horas a temperatura ambiente. Para finalizar, neutralizar esta mezcla adicionando 1 volumen de NaOH 2,5 N. Mezclar con cuidado y, así, la solución podrá ser descartada directamente en la pileta bajo agua corriente.

7. PROCEDIMIENTO VIRTUAL

Siga los pasos de esta simulación virtual de una electroforesis en gel de agarosa, use el nivel 3.
https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:5d12867d:lx_simulation:1

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Somma, M. & Querci, Maddalena. (2006). The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms.
2. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. Journal of visualized experiments: JoVE, (62), 3923.
3. Stellwagen N. C. (2009). Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. Electrophoresis, 30 Suppl 1(Suppl 1), S188-S195.
4. Green, M. and Sambrook J. 4Ed. 2012. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>

9. GUIA PARA LA REALIZACIÓN DEL INFORME DE LABORATORIO.

- Para el informe de la práctica se presentará uno por grupo de trabajo (máximo 4 integrantes).
- El día de la práctica se debe entregar este informe de laboratorio.
- A continuación, encontrara el formato para realizar el informe.

INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

1. FLUJOGRAMA (VALOR 0,5)

Realice un flujograma del procedimiento a seguir para desarrollar el protocolo de electroforesis en gel de agarosa, descrito en esta práctica.

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS (valor 3,0)

Desarrolle aquí las preguntas del numeral 4 de la guía (actividades previas).

3. CONCLUSIONES

Redacte una conclusión en la que establezca que utilidad tiene la electroforesis en gel en la práctica médica.

4. BIBLIOGRAFÍA

Ingresa la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver.