

ELECTROFORESIS

Este protocolo ha sido elaborado durante el desarrollo del Proyecto de Innovación, “La fina hebra que nos une”, en el I.E.S Juan Carlos I y coordinado por José María Espinosa Bernal. La financiación corrió a cargo del Centro de Profesores y Recursos, C.P.R. de la Consejería de Educación y Cultura de Murcia.

This protocol has been designed during the development of our Innovation Project "The fine thread that connects us" in our Secondary School, Juan Carlos I. Funding was provided by the Center for Teachers and Resources of the Ministry of Education and Culture of Murcia.



El contenido está disponible bajo la Licencia Internacional Reconocimiento-No Comercial-Sin Derivados de Creative Commons. Contacta con (josemaria.espinosa@murciaeduca.es) si quieres realizar adaptaciones para su distribución fuera del aula.

Content is made available under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives International License. Contact (josemaria.espinosa@murciaeduca.es) if you would like to make adaptations for distribution beyond the classroom.

Fundamento.

La electroforesis es una técnica de separación muy importante en el trabajo con biopolímeros.

Se basa en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (tampón de electroforesis) a través de un soporte reticulado y como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de una molécula viene determinado por su movilidad electroforética, que depende de la carga, el tamaño y la forma de la misma.

La técnica no solo nos permite separar dos biomoléculas diferentes, también, y comparando su movimiento con el de unos patrones identificarlas.

Los factores que influyen son:

- La matriz o soporte reticulado: La estructura tridimensional del soporte está formada por una serie de poros con unas dimensiones características. El

grado de reticulación es determinante para definir el tipo de moléculas que se pueden separar.


- El tampón de electroforesis: Ofrece una conductividad adecuada y mantiene el pH constante a lo largo del proceso, asegurando una carga constante de las moléculas que se están separando. •La estructura y naturaleza de las moléculas: Se separan en función de su carga, su tamaño y su forma. La movilidad aumenta al aumentar la carga y disminuye al aumentar el tamaño. Como para el caso concreto de los ácidos nucleicos, sus moléculas presentan cargas negativas constantes a lo largo de su estructura (debido a los grupos fosfato), lo que significa que a mayor tamaño, mayor carga. Es decir que la relación carga/tamaño es constante e independiente de su longitud. Por esa razón, el factor determinante es el rozamiento que ofrece el reticulado al paso de las moléculas, que será mayor, cuanto mayor sean estas. Por ello, los ácidos nucleicos se desplazan por el gel en función de su tamaño o su forma
- El campo eléctrico aplicado.

Electroforesis en geles de agarosa

Se trata del método más común para el análisis, purificación y obtención de DNA. Las agarosas disponibles comercialmente presentan una amplia gama de grados de pureza y especificaciones. Lo primero que tenemos que hacer es preparar el gel de agarosa en un molde, agregar el agente de tinción y esperar a que se solidifique.

La electroforesis se lleva a cabo de modo que el tampón cubra totalmente el gel. Con esta disposición se disipa mejor el calor generado por el paso de la corriente y se consigue un campo eléctrico muy eficaz. La muestra de DNA se carga en los pocillos en una disolución (idealmente en el mismo tampón de la electroforesis) a la que se incrementa la densidad con sacarosa (40% p/v) o glicerol (30% p/v), y se le añade uno o varios marcadores, como, por ejemplo, azul de bromofenol).

Equipamiento

NOMBRE	FUNCIÓN	
Cubeta electroforesis	Lugar donde colocamos el gel y se produce la migración de la bandas	
Fuente de alimentación	Produce la diferencia de potencial	
Transiluminador	Necesario para visualizar el ADN	
Centrífuga para microtubos convencional	Centrifugar los microtubos a velocidades de hasta 14.000 r.p.m	



DremelFuge	Centrifugar los microtubos a velocidades de hasta 14.000 r.p.m	
Vortex	Mezclar el contenido de un microtubo	
Micropipetas de diferentes volúmenes.		

Reactivos

NOMBRE	FUNCIÓN	PREPARACIÓN	<input checked="" type="checkbox"/>
Agarosa	Gelificante de alta pureza para la electroforesis	Comercial.	
Tampón TAE 1X	Tampón para la electroforesis y para preparar el gel.	Normalmente se prepara a partir de TAE 50X, diluyendo 50 veces	
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Patrones de ADN. que muestra fragmentos individuales de 1000, 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 200, 100..		
Tampón de carga 1X	Tampón que agregamos a la muestra para cargarla el los pocillos	Suele estar incluida el el kit de los patrones a una concentración 6X. Agregando 2 μ L de la misma a 10 μ L de una muestra, ya tenemos la concentración de trabajo	
RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution	Agente de tinción que se una al ADN para que podamos visualizarlo con un transiluminador		

Materiales

MATERIAL	<input checked="" type="checkbox"/>
Microtubos de 0,5 mL.	

Gradillas para microtubos	
Puntas de 20 y 10 μ L.	
Frascos ISO	

Procedimiento

Preparación de la agarosa al 1,2 % (50 mL)

- 1. Pesar 0,6 g de agarosa.
- 2. En una probeta, medir 50 mL de tampón TAE 1X.
- 3. Agregar a un frasco ISO, unos 40 mL de tampón TAE y calentar brevemente.
- 4. Agregar con cuidado y agitando, los 0,4 g de agarosa al frasco ISO, con la precaución de no generar grumos.
- 5. Añadir el resto de tampón TAE y calentar en el microondas (nunca a la máxima temperatura). Es necesario ir sacando el frasco y agitarlo cada cierto tiempo.
- 6. Una vez disuelto (es transparente y no quedan fibras visibles), esperamos a que se enfríe.
- 7. Agregamos 5 μ L de Red safe y agitamos.

Preparación del molde de electroforesis

1. Pasamos al molde para que se gelifique. En dicho molde ya tiene que estar colocado el peine para las muestras.
2. Pasamos el molde a la cubeta, agregamos el tampón de electroforesis y quitamos los peines.
3. El tampón debe cubrir el gel, pero no demasiado. Pasamos al molde para que se gelifique. En dicho molde ya tiene que estar colocado el peine para las muestras.
- 4.
5. Pasamos el molde a la cubeta, agregamos el tampón de electroforesis y quitamos el peine

Preparación de las muestras.

1. Pasamos 10 μ L de muestra a un microtubo de 0,5 μ L.
2. Agregamos 2 μ L de tampón de carga, que suele estar incluido en el kit donde vienen los patrones.
3. Agitamos con vortex y centrifugamos brevemente.



<i>Muestra</i>	<i>Tampón de carga</i>
10 μ L	2 μ L

Condiciones electroforesis.

Se introduce en cada pocillo 10 μ L de muestra y tantos patrones como deseemos. Ajustamos en nuestro equipo de electroforesis las siguientes condiciones.

<i>Voltaje</i>	120 V
<i>Tiempo</i>	30 min

Una vez terminada la electroforesis, comprobamos las bandas con un transiluminador.