

	<b>Guía Unificada de Laboratorios</b>	<b>Código</b>	GLA-01 V. 00
		<b>Página</b>	1 de 1

**AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA**

**1. Título:**

**Electroforesis de DNA**

**2. Objetivo**

**Conocer los principios básicos de la electroforesis horizontal en geles de agarosa y aplicarlo para la separación de DNA humano, plasmídico, recombinante y productos de PCR.**

**3. Marco teórico**

La electroforesis es una técnica de laboratorio utilizada para separar moléculas cargadas colocadas en un campo eléctrico. Las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el polo negativo y las cargadas negativamente hacia el polo positivo. Uno de los factores que afecta la separación de las moléculas en una electroforesis es su carga. Para el caso del DNA, los grupos fosfato le dan la carga a la molécula. Los grupos fosfato son grupos ácidos con pK bajos, esto significa que a pH neutro (7.0 – 7.5) sus grupos hidroxilo pierden los protones (H+) y quedan cargados negativamente. Por lo anterior, los ácidos nucleicos (DNA y RNA) son moléculas cargadas negativamente a pH neutro, en un sistema electroforético se desplazarán hacia el polo positivo.

Un mecanismo para separar moléculas por electroforesis se basa en que tengan diferente carga, ello hace que se desplacen hacia uno u otro polo y que lo hagan a diferente velocidad, es decir, separación de moléculas por diferencia en su movilidad electroforética. Para el caso del DNA, se considera que, independiente de su tamaño, todos tienen la misma movilidad electroforética. Para separar moléculas de DNA de diferente tamaño se incluye en el sistema la utilización de geles, tanto de agarosa como poliacrilamida (acrilamida más bis-acrilamida).

El gel consiste en un soporte sólido, poroso, a través del cual el DNA tiene que desplazarse durante la electroforesis. Las moléculas de menor tamaño se desplazarán a una mayor velocidad que las moléculas de mayor tamaño. Todas las de un determinado tamaño se desplazarán la misma distancia en un tiempo dado.

Cuando se utilizan geles de poliacrilamida la resolución de las electroforesis de DNA es mayor, es decir, permite discriminar entre DNAs con diferencias mínimas de tamaño, en el caso de las electroforesis de secuenciación, permite diferenciar un DNA de 100 bases de otro de 101 bases.

Por su naturaleza y por las cantidades pequeñas que manejamos en el laboratorio, el DNA no es visible al ojo humano. Para visualizar el DNA utilizamos técnicas de coloración. La más usada por su sensibilidad, sencillez y rapidez es la visualización con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia que se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA y al excitarlo con luz ultravioleta emite luz visible, es decir, es una sustancia fluorescente. El bromuro de etidio es mutagénico y para su visualización se

	<b>Guía Unificada de Laboratorios</b>	<b>Código</b>	GLA-01 V. 00
		<b>Página</b>	2 de 1

**AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA**

requiere de una lámpara de luz ultravioleta, por esas razones su aplicación con fines académicos ha sido limitada. Recientemente contamos con un colorante seguro para visualizar DNA, Bio-Safe DNA, aunque de menor sensibilidad, evita los inconvenientes del bromuro de etidio, no es mutagénico y para la visualización no se requiere lámpara de luz ultravioleta. La sensibilidad del bromuro de etidio es de 1 ng, mientras para Bio-safe de 10 ng.

Una vez separados los ácidos nucleicos, estos pueden ser transferidos a membranas (papel) de celulosa o nylon por capilaridad.

La electroforesis se hace con varias finalidades: evaluar el resultado de un proceso de extracción de DNA, comparando un DNA de concentración y tamaño conocidos se puede estimar el tamaño y cantidad de otro, evaluar el resultado de una amplificación realizada por PCR, separar DNA de diferente tamaño (producidos al cortar con enzimas de restricción), separar DNA para transferirlo a membranas con el fin de hacer hibridación con sondas, etc.

La extracción de DNA, corte con enzimas de restricción, separación por electroforesis, transferencia a membranas y la hibridación con sondas; son procedimientos que se realizan con fines diagnósticos, identificación de personas en medicina forense y en estudios de paternidad, entre otros.

Concentraciones de agarosa apropiadas según el tamaño de los fragmentos que se deseen separar:

% Agarosa	Fragmentos DNA (kb)
0.5	30 a 1
0.7	12 a 0.8
1.0	10 a 0.5
1.2	7 a 0.4
1.5	3 a 0.2

**4. Materiales equipos e insumos**

- Estufa, plancha de calentamiento u horno microondas
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis
- Soporte para preparación de geles de agarosa
- Peinilla
- Pipetas de 10 mL
- Micropipeta graduable P20

**5. Reactivos**

	<b>Guía Unificada de Laboratorios</b>	<b>Código</b>	GLA-01 V. 00
		<b>Página</b>	3 de 1

**AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA**

Buffer TAE o TBE 1 X

Agua desionizada

Agarosa

DNA

Buffer de carga: azul de bromofenol 0.25 %, xylene cyanol 0.25 % y glicerol 80 %

Colorante Bio-Safe DNA, SYBR-green o Bromuro de etidio (10 mg/mL)

**6. Procedimiento**

Esta práctica se realizará varias veces, para: visualizar el DNA humano, visualizar el DNA digerido con enzimas de restricción, visualizar el DNA plasmídico, visualizar el DNA ligado y visualizar el producto de PCR.

1. Familiarizarse con los materiales que van a utilizar:

Cámara de electroforesis

Fuente de poder

Micropipetas

2. Los estudiantes de deben organizar en grupos de cuatro o cinco.
3. En la estufa o un horno microondas, se calienta hasta licuefacción la agarosa al % apropiado y preparada en TAE o TBE 1 X. El TAE corresponde al buffer de la electroforesis. TAE contiene Tris-base, ácido acético glacial y EDTA, el pH del buffer es 7.5.
4. Coloque el soporte de gel. Sirva 40 mL de agarosa en el caso del sistema de preparación de geles. Coloque la peinilla después de servir la agarosa. Si se dispone, utilice preferiblemente los aditamentos para preparación de los geles que vienen con la cámara de electroforesis.
5. Espere 20 minutos para la solidificación de la agarosa.
6. Agregue 5 mL de TAE o TBE 1X sobre el gel en los sitios donde esta insertada la peinilla.
7. Retire cuidadosamente la peinilla.
8. Agregue buffer a la cámara, TAE o TBE 1 X, hasta cubrir completamente el gel 1 o 2 mm.
9. Agregue a las muestras de DNA ¼ de buffer de carga.

	<b>Guía Unificada de Laboratorios</b>	<b>Código</b>	GLA-01 V. 00
		<b>Página</b>	4 de 1

**AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA**

10. Siembre 10 µl de cada muestra de DNA en pozos separados del gel, utilice la micropipeta P20 con las puntas correspondientes. Una de las muestras de DNA corresponde a 500 ng de marcador de tamaño DNA Lambda EcoRI-Hind, o del que se disponga, con buffer de carga.
11. Tape la cámara. Conectar la cámara a la fuente. Encienda la fuente. Coloque en voltaje constante. Colocar en 10 voltios/cm, según la distancia entre los electrodos de la cámara. Iniciar la separación o corrida.
12. Deje la electroforesis 30 minutos. Pare la corrida. Apague la fuente.
13. Saque los geles y colóquelos en una caja de petri, agregar el colorante Bio-Safe (PROMEGA) DNA SYBR-green, deje 20 minutos, retire el colorante. Colocar los geles en agua y observar. Alternativamente sumerja el gel en una solución 2 µg/mL de bromuro de etidio, deje por 20 minutos y observe el gel con una lámpara de luz ultravioleta (LUV). Tenga las precauciones de trabajar con bromuro de etidio y LUV, es decir, utilice guantes y proteja los ojos con lentes especiales.

**7. Bibliografía**

- J. Sambrook; E.F. Fritsch, T. Maniatis, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** CSHL press 2001
- Fred M. Ausubel; Roger Brent; Robert E. Kingston; David D. Moore; J.G. Seidman; John A. Smith; Kevin Struhl **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley and Sons, Inc, 1998
- Contreras J, Pinilla G, Beltrán R, Wasserman M, Rojas M O **Manual de Técnicas Básicas. Primer Curso Institucional sobre Biología Molecular** ISBN 958-13-0083-X .1 ed. Bogotá : Instituto Nacional de Salud, 1991, v.1. p.30.
- Concepción Puerta y Claudia Urueña. **Prácticas de Biología Molecular**. Editorial Pontificia Universidad Javeriana, 2005



**AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA**

