

PRÁCTICA VII

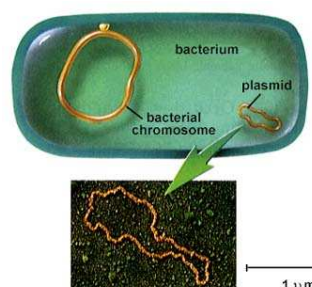
ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA. CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DE ADN PLASMÍDICO

1. Objetivo

Analizar mediante electroforesis en gel de agarosa ADN plasmídico intacto y cortado con enzimas de restricción. Además determinaremos los tamaños moleculares de las muestras problema haciendo una recta patrón de fragmentos de ADN de peso molecular conocido

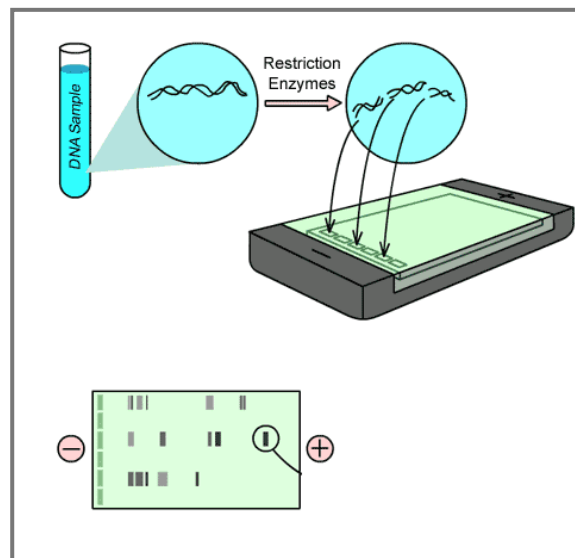
2. Fundamento Teórico

Las bacterias principalmente, y algunas levaduras, contienen moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Su tamaño varía desde 1 a 250 kb. Las moléculas de ADN plasmídico adoptan una conformación tipo doble hélice al igual que el ADN cromosómico. A diferencia del ADN cromosómico los plásmidos no tienen proteínas asociadas. En la mayoría de los casos se considera material genético dispensable. Sin embargo, posee información genética importante para las bacterias. Por ejemplo, los genes que codifican para las proteínas que hacen a las bacterias resistentes a los antibióticos están, frecuentemente, en los plásmidos.



La electroforesis en gel de agarosa es la técnica de separación más utilizada para el análisis y caracterización de ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño y conformación van a migrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. La aplicación de marcadores de peso

molecular (fragmentos de ADN de tamaño conocido) permite calcular el tamaño aproximado del ADN en estudio. En el caso de los geles de agarosa, se añade bromuro de etidio o algún colorante comercial (GelRed, GelGreen, SYBR Green...), sustancias que se intercalan entre las bases del ADN y son fluorescentes cuando se ilumina con luz ultravioleta. Una vez finalizada la electroforesis se visualiza el gel con una lámpara de luz UV y se verán las bandas correspondientes a las muestras problema de ADN y los marcadores de peso molecular.



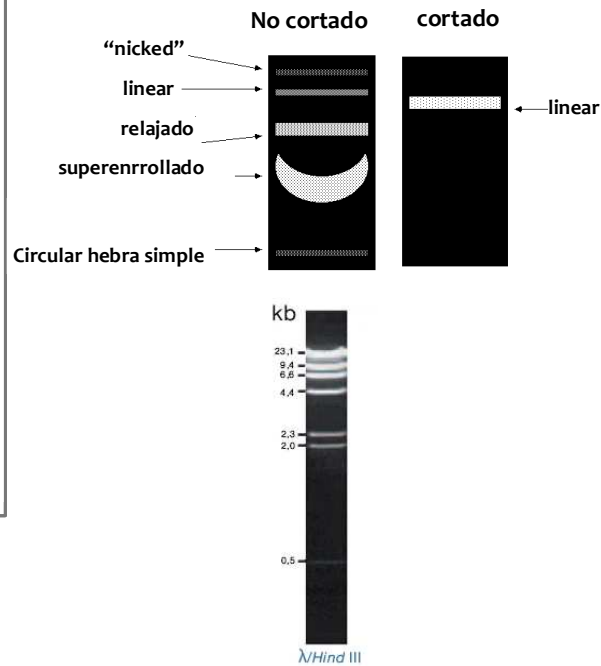
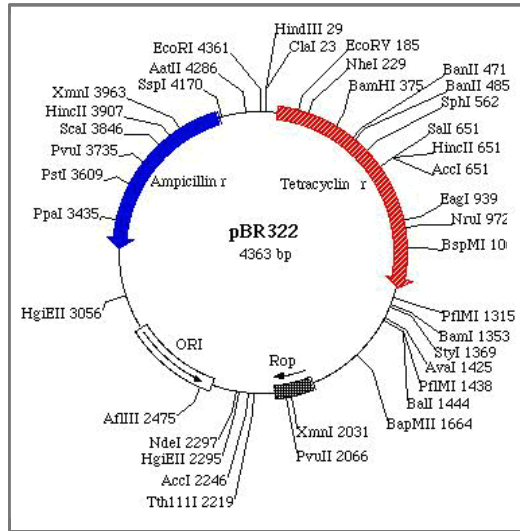
3. Materiales

Reactivos

- Agarosa
- TBE (Tris-borato) 5x : 54 g Tris base, 27.5 g ácido bórico, 20 ml 0.5M EDTA
- Agua destilada
- Tampón de carga
- Colorante fluorescente SYBR Green
- Marcador de peso molecular, fago λ HindIII
- ADN plasmídico intacto y cortado

Materiales

- Cámara de electroforesis horizontal
- Bandejas para la preparación del gel
- Peines para las bandejas
- Fuente de alimentación
- Transiluminador
- Probetas
- Matraces
- Pipetas automáticas
- Guantes



4. Métodos

4.1. Preparación de un gel de agarosa al 0.8%

- Preparar la bandeja sellando los bordes, por presión o con cinta adhesiva y colocar los peines.
- Preparar 30 ml TBE-agarosa al 0.8 %.
- Calentar en el microondas o en el baño María hasta su completa disolución
- Cuando la temperatura de la solución haya bajado lo suficiente como para poder coger el matraz con la mano añadir la solución fluorescente.
- Mezclar bien, agitando la solución y evitando que se formen burbujas en la solución.
- Verter lentamente la solución en la bandeja desde uno de los extremos de la bandeja; retirar las burbujas que quedan sobre el área de migración de las muestras con una punta limpia.
- Esperar a que el gel se solidifique.
- Una vez solidificado llenar la cubeta de electroforesis con tampón TBE 0,5 X hasta cubrir el gel.

4.2. Migración de las muestras

- Cargar las muestras a las que previamente se les ha añadido tampón de carga.
- Tapar la cubeta de electroforesis y conectar los electrodos de la cubeta a la fuente.
Comprobar que está bien conectada.
- Programar la fuente a unos 100 Voltios y dejar migrar las muestras durante 30-45 minutos.
- Una vez acabada la electroforesis se visualizan las bandas de ADN mediante luz UV.

5. Ejercicios y preguntas

- Dibuja la recta patrón correspondiente a los tamaños (expresado en pares de bases) de las bandas del marcador de peso molecular.
- Calcula el tamaño, expresado en pares de bases, de cada una de las bandas que veas en la muestra correspondiente al plásmido intacto y a la muestra de plásmido cortado con las enzimas de restricción.
- ¿A que se deben las diferentes bandas correspondientes a la muestra de ADN plasmídico intacto?
- ¿Por qué se utiliza el fago λ como marcador de peso molecular?
- ¿Que observaríamos si preparáramos el gel de agarosa a una concentración del 5%?
- ¿Cuál es la razón de utilizar sustancias intercalantes para la visualización del ADN?