

ELECTROFORESIS DE ADN

Francisco Fierro Fierro¹

INTRODUCCIÓN

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética. La idea de utilizar la técnica de electroforesis a través de una matriz para analizar muestras de ADN corresponde a Vin Thorne, un bioquímico del Instituto de Virología de Glasgow, quien a mediados de los años 60 del pasado siglo estaba interesado en caracterizar las distintas formas de ADN que se

* Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco #186, Colonia Vicentina, Delegación Iztapalapa. CP 09340 México D.F. fierrof@xanum.uam.mx.

obtenían de partículas purificadas de polyomavirus. Su razonamiento era que una combinación de fuerzas eléctricas y de fricción permitiría el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN. Éste es exactamente el principio en que se basa la electroforesis de ácidos nucleicos. Sometidos a un campo eléctrico, la carga neta negativa del ADN y el ARN hará que estos se muevan en dirección al ánodo (Figura 1A). Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación.

Mediante la electroforesis en gel de agarosa, Thorne logró separar y visualizar tres formas topológicas diferentes del ADN del polyomavirus: superenrollada, relajada y lineal, tras haber marcado el ADN con [^3H] timidina (Thorne 1966, 1967). El trabajo de Thorne recibió poca atención hasta principios de los años 70, cuando el empleo de enzimas de restricción permitió el análisis de moléculas de ADN mucho más grandes que los genomas virales. También resultó de gran importancia el desarrollo de métodos no radiactivos de tinción del ADN con suficiente sensibilidad para detectar cantidades de ADN del orden de nanogramos e inferiores. La utilización de bromuro de etidio para la detección de ADN en geles se desarrolló independientemente por dos grupos (Aaij y Borst 1972, Sharp *et al.* 1973), cuyos métodos siguen utilizándose hasta hoy sin apenas variaciones.

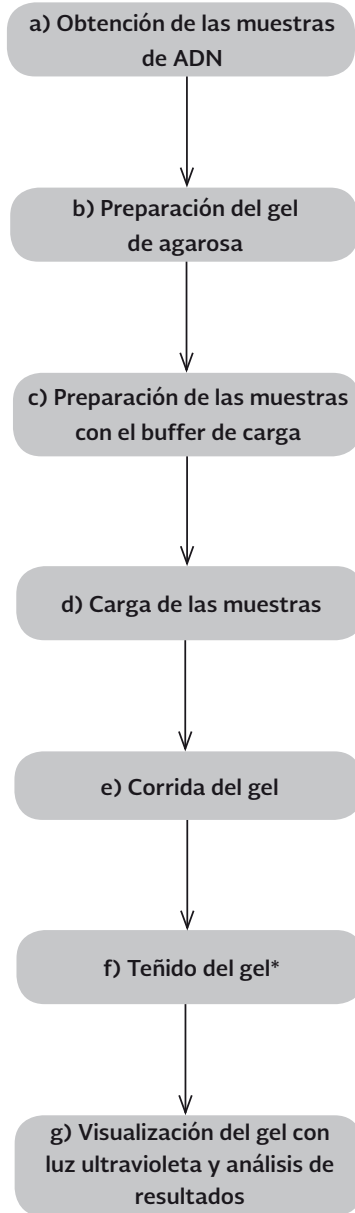
La electroforesis de ADN puede realizarse en geles de agarosa o de poliacrilamida. Ambos tienen características diferentes en cuanto a sus propiedades y modo de preparación, por lo que se utilizará uno u otro en función de la aplicación y objetivos que persigamos. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Por su parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar (5–600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases. Los geles de poliacrilamida se corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación.

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unas 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa. Este rango de tamaños hace a los geles de agarosa ideales para analizar el producto de digestiones con enzimas de restricción, lo que puede combinarse con otras técnicas como el Southern blot, así como para analizar los productos de una reacción de PCR. Los geles de agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante.

La electroforesis en gel de agarosa tiene un límite superior de unas 40-50 kb en el tamaño de las moléculas de ADN que puede separar. Por lo tanto, no es posible separar el producto de digestiones con enzimas de restricción de corte infrecuente, como *NotI* o *SfiI*, y menos aún separar cromosomas enteros (los cromosomas de eucariotas inferiores tienen tamaños de entre 0.2 y 12 Mb). Reducir la concentración de agarosa hasta un 0.1 o 0.2% puede incrementar el límite de separación hasta los 750 pb, sin embargo estos geles son extremadamente frágiles y muy difíciles de manipular.

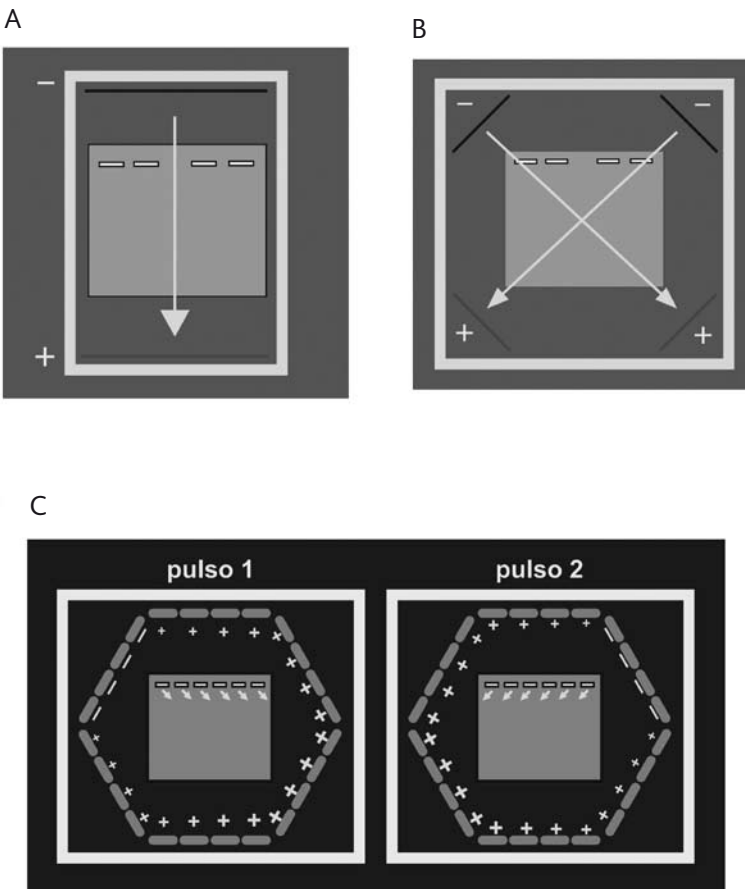
Esta limitación de tamaños se superó con el desarrollo de una técnica denominada electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Figura 1B). Esta técnica fue descrita inicialmente por Schwartz y Cantor (1984), quienes construyeron un aparato de electroforesis ortogonal en el cual dos campos eléctricos en ángulo sobre el gel funcionaban de forma alterna. El fundamento de esta técnica es la reorientación de las moléculas cuando cambia la dirección del campo eléctrico; en la electroforesis convencional las moléculas de ADN de gran tamaño quedan “atrapadas” en la malla que forma la agarosa en su avance a través del gel, pero la aplicación de dos campos eléctricos alternantes en ángulo permite una reorientación de las moléculas que de esta forma avanzarán un tramo más, antes de quedar de nuevo atrapadas. Cuanto más grandes son las moléculas mayor debe ser la duración de los campos eléctricos alternos para permitir la reorientación y en última instancia la separación de las mismas. Además de la duración del tiempo de los pulsos, otros parámetros como la

Etapas de la técnica



* Sólo en caso de no utilizarse bromuro de etidio en el gel.

Figura 1. A) Esquema del sistema de electroforesis convencional en gel de agarosa. El rectángulo representa la cámara de electroforesis con los electrodos positivo y negativo, y en el centro en gris más claro el gel de agarosa con sus pocillos. La flecha indica la dirección de migración del ADN. B) Esquema del fundamento del sistema de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), en este sistema dos campos eléctricos en ángulo sobre el gel funcionan de forma alternante. C) Esquema de uno de los sistemas de electroforesis en gel de campo pulsado más utilizados, el CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*). Las líneas formando un hexágono representan los electrodos. La distribución de cargas permite que el campo eléctrico sea homogéneo en todo el gel y de esta forma evitar distorsiones en la migración del ADN en los diferentes carriles.



intensidad y el ángulo que forman los campos eléctricos determinan el rango de tamaños que pueden separarse. Desde la invención del primer aparato de PFGE, la técnica se ha mejorado y se ha aumentado el límite superior de tamaños (Fierro *et al.* 2001), desarrollándose otros sistemas como el CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*) (Figura 1C), que han permitido la resolución de cromosomas de eucariotas inferiores como los de los hongos *Neurospora crassa* (Orbach *et al.* 1988) y *Penicillium chrysogenum* (Fierro *et al.* 1993) con tamaños de hasta 10-12 Mb.

PROTOCOLO

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$. Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm (Kirkpatrick 1990). Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de agarosa que es recomendable utilizar en función del rango de tamaño que pretendamos separar.

Equipo

- Cámara horizontal de electroforesis con los accesorios correspondientes (molde para hacer el gel, peine, cables para conectar a la fuente de alimentación)
- Fuente de alimentación o de poder

- Transiluminador (fuente de luz ultravioleta)
- Equipo fotográfico que permita tomar fotos del gel

Estos dos últimos aparatos es preferible sustituirlos por un equipo de análisis de geles, el cual incluye la fuente de luz ultravioleta, el equipo fotográfico para la toma y digitalización de imágenes, y un equipo de cómputo con *Software* que permite distintos tipos de análisis, como el densitométrico. Ejemplos de este tipo de equipos son el Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Biorad, o el ImageQuant 300 de GE Healthcare.

Además se requerirá de un potenciómetro, una balanza y una autoclave para preparar y esterilizar las soluciones necesarias.

Tabla 1. Rango de separación de tamaños de ADN en función de la concentración y el tipo de agarosa utilizados.

Agarosa (%)	Estándar	Alta fuerza de gel (<i>High gel strength</i>)	Gel de baja temperatura de fusión (<i>Low gelling/melting temperature</i>)	Gel de baja temperatura de fusión y baja viscosidad (<i>Low gelling/melting temperature, low viscosity</i>)
0.3	1 kb – 40 kb			
0.5	700 pb – 25 kb			
0.8	500 pb – 15 kb	800 pb – 10 kb	800 pb – 10 kb	
1.0	250 pb – 12 kb	400 pb – 8 kb	400 pb – 8 kb	
1.2	150 pb – 6 kb	300 pb – 7 kb	300 pb – 7 kb	
1.5	80 pb – 4 kb	200 pb – 4 kb	200 pb – 4 kb	
2.0	60 pb – 2.5 kb	100 pb – 3 kb	100 pb – 3 kb	
3.0			50 pb – 1 kb	50 pb – 1 kb
4.0				100 pb – 500 pb
6.0				10 pb – 100 kb

Material

- Micropipetas
- Puntas para micropipeta
- Tubos tipo *ependorf*

- Un matraz, probetas y vasos de precipitados para la preparación de soluciones
- Espátulas
- Guantes impermeables para el manejo del bromuro de etidio

Reactivos

- Agarosa (CAS N° 9012-36-6)
- Tris base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, CAS N° 77-86-1)
- Ácido acético glacial (CAS N° 64-19-7)
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, CAS N° 60-00-4)
- Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3)
- NaOH (hidróxido de sodio, CAS N° 1310-73-2)
- Sacarosa (CAS N° 57-50-1)
- Glicerol (CAS N° 56-81-5)
- Azul de bromofenol (CAS N° 115-39-9)
- Xileno cianol (CAS N° 2650-17-1)
- Bromuro de etidio (CAS N° 1239-45-8)

Soluciones y *buffers*

Como *buffer* de electroforesis y para la preparación del gel puede utilizarse opcionalmente TAE (Tris-Acetato EDTA) o TBE (Tris-Borato EDTA). El TAE tiene una menor capacidad de amortiguación que el TBE, y puede resultar en una acidificación del medio si la electroforesis se desarrolla durante un periodo muy prolongado, pero funciona muy bien con tiempos normales de electroforesis, además tiene una mayor capacidad de resolución que el TBE para tamaños grandes de ADN. Ambos suelen prepararse como soluciones concentradas, que pueden almacenarse a temperatura ambiente (previa esterilización en autoclave), éstas se diluyen con agua antes de cada electroforesis para lograr la concentración de uso: 1x para el TAE y 0.5x para el TBE.

Buffer TAE (50x) 1 L

Tris base, 242 g; ácido acético glacial, 57.1 ml; 0.5 M EDTA pH 8, 100 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

Buffer TBE (5x) 1 L

Tris base, 54 g; ácido bórico, 27.5 g; 0.5 M EDTA pH 8, 20 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

El EDTA debe estar preparado previamente: Se añade al agua destilada o desionizada (un volumen 20% inferior al volumen final deseado) la cantidad adecuada de EDTA para obtener una concentración final de 0.5 M. Se ajusta el pH con NaOH hasta que el EDTA se disuelva y llegue la solución a un pH de 8. Se ajusta el volumen, se esteriliza y se conserva a temperatura ambiente.

Buffer de carga

El *buffer* de carga debe tener una alta densidad que permita que la muestra se introduzca en el pocillo del gel, además de colorantes que nos indiquen cuando debe detenerse la electroforesis. Existen varios tipos de *buffers* de carga, a continuación se detallan los dos más utilizados (la inclusión de xileno cianol es opcional)

- *Buffer* de carga tipo I (6x): 0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 40% sacarosa, en agua. Almacenar a 4°C.
- *Buffer* de carga tipo II (6x): 0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 30% glicerol, en agua. Almacenar a 4°C.

Solución de bromuro de etidio

El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante (se intercala entre las bases nitrogenadas) que se usa como colorante fluorescente para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida. El BrEt absorbe luz ultravioleta de $\lambda \approx 300$ nm, y emite una luz anaranjada de 590 nm, mediante la cual podemos observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel tras la electroforesis.

La solución stock de BrEt se prepara a una concentración de 10 mg/ml en agua, y se conserva a temperatura ambiente o a 4°C en un tubo envuelto en papel de aluminio. Existen dos formas diferentes de realizar el teñido del ADN:

1. Preparar el gel con BrEt incorporado.
2. Teñir el gel una vez finalizada la electroforesis con una solución de BrEt.

En ambos casos, la concentración final del BrEt en el gel o en la solución de teñido debe ser de 0.5 µg/ml.

Existen alternativas a la tinción con BrEt. El *SYBR Gold* (nombre comercial) es un colorante muy sensible con una elevada afinidad por el ADN, que puede detectar cantidades de tan sólo 20 pg de ADN. Se utiliza en una dilución 1/10 000 en agua para el teñido del gel tras la electroforesis. Su elevado precio hace que sólo sea recomendable su uso para la detección de cantidades muy pequeñas de ADN que no sean detectables mediante tinción con BrEt. Otros colorantes disponibles actualmente son el *SYBR Green*, también de alta sensibilidad, y el *SYBR Safe*, con una sensibilidad similar al BrEt pero menor capacidad mutagénica. Existen además toda una nueva gama de colorantes con diferentes propiedades para la tinción del ADN; compañías como Invitrogen han desarrollado un buen número de estos colorantes, con diferentes niveles de sensibilidad y destinados a diferentes aplicaciones (ver referencia en <http://www.invitrogene.com>).

Antes de empezar

Para realizar la técnica de electroforesis de ADN en gel de agarosa debe estar preparado el siguiente material antes de comenzar: muestras de ADN, marcador de tamaño o peso molecular, buffer de electroforesis (TAE o TBE), buffer de carga, solución de teñido de bromuro de etidio, además de todo el equipo de laboratorio y material que se indican en las secciones correspondientes.

Marcador de tamaños. La utilización de un marcador de tamaño es fundamental para tener una referencia de los tamaños del ADN en las muestras. Algunos de los más utilizados son: Lambda 1 kb ladder (fermentas), GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas), y ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*.

Método

1. Preparación del gel de agarosa
 - 1.1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para obtener la concentración deseada (ver Tabla 1) en función del volumen de gel.
 - 1.2. Añadir la agarosa al *buffer* (TAE 1x o TBE 0.5x) en un matraz.
 - 1.3. Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta que se observe que toda la agarosa se ha fundido.
 - 1.4. Dejar enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de unos 50 °C (Nota: si se opta por añadir el BrEt al gel debe realizarse en este momento, a una concentración final de 0.5 µg/ml).
 - 1.5. Mientras la solución de agarosa se enfría, preparar el molde en el que se va a hacer el gel sellando los bordes con cinta masking, o colocándolo en el dispositivo previsto para ello, y colocando el peine en la posición deseada.
 - 1.6. Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar que solidifique durante al menos 30 min.

2. Preparación de las muestras
 - 2.1. Mezclar tanto las muestras de ADN como el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del *buffer* de carga 6x. El volumen total estará determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente 15-30 µl.

3. Carga de las muestras y corrida del gel
 - 3.1. Una vez que el gel ha solidificado retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis.
 - 3.2. Añadir *buffer* de electroforesis (TAE 1x o TBE 0.5x) hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.
 - 3.3. Retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.
 - 3.4. Cargar en los pocillos las muestras que se prepararon en el paso 7. *Nota:* Dependiendo del tipo de muestra y del marcador, frecuentemente es conveniente calentar a 65°C las muestras durante 3-5 min y enfriarlas en hielo antes de cargarlas.
 - 3.5. Conectar los cables a la fuente alimentación y aplicar un voltaje de 20-150 V (1-5 V/cm de acuerdo a la distancia entre los electrodos). El ajuste del voltaje es muy variable dependiendo de la cámara y de los

tamaños que se pretenden separar, se recomienda voltajes no muy altos para tamaños muy grandes del ADN.

Nota: Debe tenerse en cuenta que el ADN migra hacia el ánodo, por lo que debe disponerse correctamente la orientación del gel y de los cables.

3.6. Correr el gel hasta que el colorante azul de bromofenol esté a una distancia del borde de aproximadamente un 25% de la longitud total del gel. En ese momento debe detenerse la electroforesis.

4. Tinción del gel y visualización del ADN

4.1. Si no se añadió el BrEt al gel (paso 1.4), éste debe teñirse una vez finalizada la electroforesis. Para ello se saca el gel de su molde y se sumerge en una solución de BrEt (0.5 µg/ml) durante al menos 15 min.

Nota: Ambas formas de tinción rinden resultados similares, pero se recomienda la tinción una vez finalizada la electroforesis para mantener el molde, peine y cámara libres de BrEt.

4.2. Colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda \approx 300$ nm), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado.

4.3. (Opcional) Si hay bandas de tamaño pequeño que no se visualizan bien puede hacerse una etapa de desteñido con H₂O o 1 mM MgSO₄ durante 20 min.

4.4. Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible.

Electroforesis en gel de campo pulsado

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) permite la separación de moléculas de ADN de tamaño muy elevado (ver introducción). Las principales diferencias con la electroforesis convencional se encuentran en la preparación de las muestras, el equipo de electroforesis y la elección de los parámetros (tiempo de pulsos, voltaje, etc.) en función del rango de tamaños que se pretende separar. A continuación se indica cómo afectan diferentes parámetros al rango de separación en la PFGE, tomando como referencia el sistema CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*):

Tiempo de pulsos. Es el parámetro clave que determinará el rango de tamaños que se puedan separar en una electroforesis PFGE. Cuanto mayor sea el tamaño a separar mayor debe ser el tiempo de pulsos. Las mejores resoluciones se obtienen realizando una rampa de tiempos, es decir, se comienza la electroforesis

con un tiempo de pulsos determinado (por ejemplo, 60 seg) y éste va subiendo gradualmente hasta un valor final (por ejemplo, 150 seg) que se alcanza al finalizar la electroforesis. Los valores que se dan a continuación son aproximados:

Tamaño	Tiempo de pulsos
10 - 800 Kb	6-80 seg
100 Kb - 1 Mb	60-90 seg
0.2 Kb - 2 Mb	60-120 seg
1 - 3 Mb	5-20 min
3 - 6 Mb	20-75 min
5 - 11 Mb	75-220 min

Intensidad de campo (voltaje). Moléculas de ADN de hasta 2 Mb de tamaño pueden separarse con voltajes de 4-6 V/cm. Tamaños mayores requieren voltajes más bajos para evitar la rotura del ADN; moléculas de 2 a 5 Mb se separan bien con 1.2 a 3.5 V/cm, mientras que moléculas de muy elevado tamaño (> 6 Mb) requieren voltajes de 1-1.5 V/cm.

Tiempo total de electroforesis. Este parámetro está muy relacionado con el anterior. Cuanto más grandes son los tamaños a separar se requieren voltajes más bajos, y como consecuencia tiempos más largos. Tamaños hasta 2 Mb pueden resolverse en 24-48 h. Tamaños entre 2 y 6 Mb necesitarán tiempos de 3-7 días. Y tamaños superiores a 6 Mb necesitarán siempre tiempos no inferiores a 6 días.

Concentración de agarosa. Mientras que en la electroforesis convencional este parámetro es crucial para separar distintos rangos de tamaños, en la PFGE su importancia no es tan grande. Tamaños mayores de ADN requerirán concentraciones de agarosa más bajas. Las concentraciones que se utilizan con más asiduidad son de 0.6-1.2% (p/v).

Ángulo de separación de los campos eléctricos alternantes. Suele depender del diseño del equipo de electroforesis, a veces puede ser ajustado y a veces no. El ángulo oscila entre 96° y 165°, y los que se usan con más frecuencia son 110-120°. En general un ángulo mayor permite una mejor resolución en tamaños pequeños (10-500 Kb).

Temperatura. El *buffer* de electroforesis tiene que estar refrigerado entre 4-15°C, para lo cual los sistemas de PFGE comerciales disponen de un refrigerador. La temperatura baja permite una mejor definición de las bandas en el gel.

Equipo

- Un equipo completo para electroforesis en gel de campo pulsado (sistemas OFAGE, CHEF, RGE, etc.) (Fierro *et al.* 2001), con su fuente de alimentación, refrigerador del *buffer*, molde para preparación de muestras, charola para preparar el gel y peine.
- Un transiluminador (fuente de luz ultravioleta) y equipo fotográfico. O preferiblemente un equipo integrado de análisis de geles (ChemiDoc system de Biorad o similar).
- Además se requerirá de un potenciómetro, una balanza y una autoclave para preparar y esterilizar las soluciones necesarias.

Material

El mismo que para la electroforesis convencional en gel de agarosa.

Reactivos

- Agarosa (CAS N° 9012-36-6) de alto grado de pureza (a veces denominada de grado cromosomal)
- Agarosa de bajo punto de fusión
- Tris base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, CAS N° 77-86-1)
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, CAS N° 60-00-4)
- Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3)
- NaOH (hidróxido de sodio, CAS N° 1310-73-2)
- Bromuro de etidio (CAS N° 1239-45-8)

Soluciones y *buffers*

Como *buffer* de electroforesis y para la preparación del gel se utiliza TBE 0.5x (ver protocolo de la electroforesis convencional en gel de agarosa).

Solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en buffer TBE 0.5x. Esterilizar y conservar a temperatura ambiente una vez que solidifique.

Solución de bromuro de etidio (ver protocolo de la electroforesis convencional en gel de agarosa). El gel se tiñe siempre después de la electroforesis, no se añade el BrEt al gel durante su preparación.

Método

1. Preparación de las muestras

1.1. La obtención de ADN cromosomal intacto o de muy alto peso molecular debe realizarse lisando células que están previamente inmovilizadas en bloques de agarosa de bajo punto de fusión. De esta forma se evitan las roturas de las hebras de ADN que se producirían en una solución líquida. Las células son entonces sometidas a un tratamiento para provocar su lisis y la liberación del ADN, que quedará embebido en el bloque de agarosa, cargándose éste directamente en el gel. Existen diferentes protocolos en función del tipo de células: células animales (Sambrook y Russell 2000a), levaduras y hongos (Sambrook y Russell 2000b). Cuando la PFGE se utiliza para separar los productos de digestión con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, el proceso de digestión se lleva a cabo con el ADN dentro del bloque de agarosa, hacia el cual las enzimas difunden desde una solución acuosa (ver protocolo descrito por Sambrook y Russell 2000c).

2. Preparación del gel de agarosa

2.1. El gel de agarosa se prepara de forma idéntica a como se describió para los geles de la electroforesis convencional, con TBE 0.5x

3. Carga de las muestras y corrida del gel

3.1. Una vez que el gel ha solidificado, retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos.

3.2. Con la ayuda de una espátula cargar los bloques de agarosa con la muestra de ADN y el marcador de tamaño en los pocillos.

3.3. Sellar los pocillos con una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en TBE 0.5x (previamente fundida), y dejarla durante al menos 15 min.

3.4. Retirar el sellado de los bordes y sacar gel del molde, para colocarlo en la cámara de electroforesis.

3.5. Añadir buffer de electroforesis (TBE 0.5x) hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.

3.6. Ajustar todos los parámetros de electroforesis (tiempo de pulsos, tiempo total, voltaje, temperatura del buffer) en el módulo de control.

3.7. Cerrar la tapa de la cámara, conectando los cables a la fuente alimentación, y comenzar el proceso de electroforesis.

3.8. En los geles de PFGE no tenemos un colorante del tipo de azul de bromofenol como referencia que nos indique cuando debemos de finalizar la electroforesis. El tiempo de corrida debe establecerse de antemano, junto con el resto de parámetros, en función de los tamaños a separar, el voltaje, lo publicado en la literatura y la propia experiencia. Si se van a separar fragmentos de restricción cuyo tamaño oscilará aproximadamente entre 6 y 500 Kb sí puede ser de utilidad cargar un pocillo con una solución de xileno cianol y finalizar la electroforesis después de que éste haya rebasado el borde del gel.

4. Tinción del gel y visualización del ADN

4.1. Sacar el gel de la cámara de electroforesis y sumergirlo en una solución de BrEt (0.5 µg/ml) durante al menos 30 min. Nota: Con frecuencia es conveniente realizar una etapa de desteñido con H₂O o 1 mM MgSO₄ durante 20 min.

4.2. Colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda \approx 300$ nm), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado.

4.3. Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible.

Electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida no desnaturalizante

La poliacrilamida es un polímero formado por largas cadenas del monómero acrilamida que se unen transversalmente mediante N,N'-metilenbisacrilamida. La principal ventaja de los geles de acrilamida sobre los de agarosa es su mayor capacidad de resolución, y además, la posibilidad de cargar una mayor cantidad de ADN, mientras que una de las desventajas es la limitación en el tamaño del ADN a separar, alrededor de 500-600 pb. El rango de tamaños que pueden separarse depende de la concentración de acrilamida en el gel (Tabla 2).

Los geles de poliacrilamida desnaturalizantes se usan para separar fragmentos de ADN monocatenario, y se utilizan en técnicas como la secuenciación, DGGE o extensión del primer, mientras que los no desnaturalizantes se usan para separar ADN bicatenario. En este capítulo describiremos únicamente

Tabla 2. Rango de separación de tamaños de ADN (cadena doble) en función de la concentración de acrilamida y migración de los colorantes en equivalencia con tamaño del ADN.

Acrilamida (%)	Rango de separación (pb)	Xileno cianol	Azul de bromofenol
3.5	1 000 – 2 000	460	100
5	80 – 500	260	65
8	60 – 400	160	45
12	40 – 200	70	20
15	25 – 150	60	15
20	6 – 100	45	12

te los geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (para los desnaturalizantes véase capítulo de DGGE).

Equipo

Se requiere el mismo equipo que para la electroforesis en gel de agarosa, a excepción de la cámara de electroforesis, la cual debe ser una cámara vertical para geles de poliacrilamida, con todo su material adicional (cristales, separadores, pinzas, peines, etc.).

Material

- Micropipetas
- Puntas
- Tubos tipo *ependorf*
- Tubos falcon o similares
- Probetas y vasos de precipitados para la preparación de soluciones
- Guantes impermeables para el manejo del bromuro de etidio y la acrilamida
- Cubrebocas si se va a utilizar acrilamida en polvo

Reactivos

- Acrilamida (CAS N° 79-06-1)
- N,N'-metilenbisacrilamida (CAS N° 110-26-9)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina, CAS N° 110-18-9)
- Persulfato de amonio (CAS N° 7727-54-0)
- Tris base (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, CAS N° 77-86-1)
- Ácido bórico (CAS N° 10043-35-3)
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, CAS N° 60-00-4)
- NaOH (hidróxido de sodio, CAS N° 1310-73-2)
- Sacarosa (CAS N° 57-50-1)
- Glicerol (CAS N° 56-81-5)
- Azul de bromofenol (CAS N° 115-39-9)
- Xileno cianol (CAS N° 2650-17-1)
- Bromuro de etidio (CAS N° 1239-45-8)

Soluciones y *buffers*

La solución acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida (29:1) suele adquirirse ya preparada, de casas comerciales como Biorad. Si se va a preparar a partir de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida sólidas, se pesan ambas (dentro de una campana extractora o usando un cubrebocas) y se disuelven en agua destilada o desionizada a una concentración final del 30% (peso/volumen) manteniendo la proporción 29:1. A continuación se filtra la solución a través de un papel de filtro y se guarda a 4°C protegida de la luz.

Como buffer de electroforesis se utiliza TBE (Tris-Borato EDTA) en concentración 1x o 0.5x (ver protocolo de la electroforesis convencional en gel de agarosa).

Buffer de carga. Se utilizan los mismos que en la electroforesis convencional en gel de agarosa.

Solución de bromuro de etidio (ver protocolo de la electroforesis convencional en gel de agarosa). El gel se tiñe siempre después de la electroforesis, no se añade el BrEt al gel durante su preparación. El SYBR Gold o la tinción con plata (véase capítulo de DGGE) son una alternativa si se usan concentraciones muy bajas de ADN.

Método

1. Preparación del gel de poliacrilamida
 - 1.1. Limpiar las superficies de los cristales con un detergente líquido y aclarar con abundante agua, haciendo un último aclarado con agua destilada o desionizada. Aclararlos finalmente con etanol y dejarlos secar.
 - 1.2. Mezclar en un tubo los componentes del gel de poliacrilamida proporcionalmente a las cantidades que se muestran en la Tabla 3, de acuerdo al porcentaje de acrilamida que se vaya a utilizar y al volumen de gel requerido. Añadirlos en el siguiente orden: H₂O, solución acrilamida/N,N'-metilbisacrilamida, TBE 5x, 10% persulfato de amonio.

Tabla 3. Volumen de los componentes para geles de poliacrilamida de diferentes porcentajes, en base a un volumen total de 100 ml.

Acrilamida (%)	Solución Acrilamida/N,N'-Metilbisacrilamida (29:1) (ml)	H ₂ O (ml)	TBE 5x (ml)	10% Persulfato de amonio (ml)
3.5	11.6	67.7	20	0.7
5	16.6	62.7	20	0.7
8	26.6	52.7	20	0.7
12	40.0	39.3	20	0.7
20	66.6	12.7	20	0.7

- 1.3. Ensamblar cristales y separadores y sujetarlos fuertemente con pinzas.

Nota: Algunos sistemas de electroforesis incluyen sistemas de ensamblaje que previenen que el gel se filtre y se salga del receptáculo de los cristales cuando está aún líquido. En caso contrario conviene hacer un sellado en la parte inferior colocando los cristales ya ensamblados sobre un pequeño volumen de agarosa 1% fundida, de modo que ésta ascienda por capilaridad unos milímetros dentro del espacio entre los cristales. Una vez solidificada la agarosa impedirá que haya filtraciones del gel por la parte inferior.

- 1.4. A la solución preparada en el punto 1.2, añadirle 50 µl de TEMED por cada 100 ml de solución. Mezclar cuidadosamente invirtiendo el tubo.

1.5. Añadir la solución con una pipeta o punta de micropipeta en el espacio entre ambos cristales, de manera que se vaya depositando en el fondo sin formar burbujas, hasta llegar a la parte superior, casi hasta el borde.

1.6. Colocar el peine entre ambos cristales cuidando que no se formen burbujas en el gel.

1.7. Dejar polimerizar el gel durante al menos 30 min a temperatura ambiente. Si el gel se retrae en la parte superior añadir más solución hasta el borde de los cristales.

2. Preparación de las muestras

2.1. Mezclar las muestras de ADN y el marcador de tamaño con 0.2 volúmenes del buffer de carga 6x. El volumen total vendrá determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente 20-30 μ l.

3. Carga de las muestras y corrida del gel

3.1. Una vez que el gel ha polimerizado retirar el peine y montar los cristales con el gel en la cámara de electroforesis.

3.2. Añadir buffer de electroforesis (TBE 0.5x) en los receptáculos inferior y superior de la cámara.

3.3. Con una punta fina de micropipeta o una jeringa Hamilton limpiar el espacio de los pocillos haciendo entrar con fuerza solución TBE 0.5x.

3.4. Cargar en los pocillos las muestras que se prepararon en el paso 2.1, utilizando una punta fina de micropipeta o una jeringa Hamilton.

Nota: Dependiendo del tipo de muestra y del marcador, frecuentemente es conveniente calentar a 65°C las muestras durante 3-5 min y enfriarlas en hielo antes de cargarlas.

3.5. Conectar los cables a la fuente de alimentación y aplicar el voltaje requerido por la cámara (polo positivo en el reservorio inferior de la cámara).

3.6. Correr el gel hasta que los colorantes estén a la distancia deseada (ver Tabla 2). Apagar la fuente de alimentación, desconectar los cables y desmontar de la cámara los cristales con el gel.

4. Tinción del gel y visualización del ADN

4.1. Abrir los cristales con una espátula y cuidadosamente despegar el gel, para sumergirlo en una solución de BrEt (0.5 μ g/ml) durante al menos 30 min. (Alternativamente, si el gel es grande o de muy bajo porcentaje, puede teñirse sin despegarlo del cristal).

4.2. Colocar el gel sobre un transiluminador y encender la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda \approx 300 \text{ nm}$), el ADN se visualizará como bandas de color anaranjado. ¡Advertencia!: La piel y sobretodo los ojos deben estar debidamente protegidos de la luz UV por bata, guantes y una pantalla o cubreojos de metacrilato.

4.3. Fotografiar el gel con el sistema fotográfico disponible.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

El análisis de los geles de agarosa y poliacrilamida se realiza preferiblemente en un aparato documentador de geles (por ejemplo el Molecular Imager ChemiDoc XRS System de Biorad), los cuales tienen incorporado un software que permite guardar fotografías del gel en formatos como TIFF, JPG, etc., además de llevar a cabo análisis densitométricos cuando se necesite realizar una cuantificación precisa de la intensidad de las bandas en el gel. Esta cuantificación puede tener distintas aplicaciones, por ejemplo la estimación de la concentración de ADN en una muestra mediante comparación con otra muestra de concentración conocida, y la comparación de las cantidades de ADNc en un experimento de RT-PCR semicuantitativa. Además los programas de análisis pueden realizar una estimación del tamaño de los fragmentos por comparación con los marcadores de peso molecular utilizados.

APLICACIONES

La aplicación básica de las técnicas de electroforesis de ADN es la separación de fragmentos de ADN en una muestra y su visualización, para comprobar aspectos como el tamaño de los fragmentos, la concentración, la entereza y otros. Los fragmentos que sean de interés pueden purificarse a partir del gel mediante diferentes técnicas de extracción, y utilizarse para diferentes propósitos (clonación, secuenciación, mutagénesis, fusión con otros fragmentos, utilización como sondas, etc.).

De forma particular, cada una de las tres técnicas que se describen en este capítulo tiene aplicaciones específicas que se indican a continuación:

La electroforesis en gel de agarosa es la más utilizada, y se aplica en todos los procedimientos indicados en el párrafo anterior. Se utiliza además muy frecuentemente para la *realización de mapas de restricción*, separándose los

fragmentos que resultan de la digestión con diferentes enzimas de restricción, mediante digestiones individuales y dobles. Con frecuencia la electroforesis en gel de agarosa se utiliza también para separar fragmentos que se transferirán a una membrana (de nailon o nitrocelulosa) para llevar a cabo la técnica de *Southern blot*. También permite la separación de fragmentos de productos de PCR y la asignación de tamaño de los mismos (ver por ejemplo capítulo de ISSRs).

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) tiene como objetivo la separación de fragmentos de ADN de tamaño elevado. Se utiliza para separar fragmentos de restricción y elaborar mapas de restricción cuando se utilizan enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, como *NotI* o *SfiI* (El-Osta et al. 2005). Asimismo ha tenido una gran aplicación en la separación de cromosomas enteros de eucariotas inferiores, principalmente hongos, para elaborar cariotipos (Fierro et al. 1993, 2001). Al igual que la electroforesis convencional, la PFGE puede aplicarse como parte de la técnica de *Southern blot*, para localizar sondas y genes específicos en un determinado cromosoma o fragmento de restricción de elevado tamaño. Una aplicación particular de la PFGE es el estudio de los polimorfismos en la longitud de los cromosomas (CLP: *Chromosome Length Polymorphisms*). Estos estudios tienen diferentes aplicaciones, como son: 1) estudios de tipificación de cepas, como en el caso de *Candida* spp. en estudios epidemiológicos, donde la comparación del cariotipo electrofórico resultó ser un buen marcador para la identificación intra- e inter-específica de cepas de *Candida* (Pittet et al. 1991); 2) análisis de reorganizaciones cromosómicas causadas por procesos de mutagénesis o transformación genética; 3) análisis de la plasticidad y variabilidad genómica en poblaciones silvestres y asignación de cariotipos específicos a fenotipos particulares; 4) estudio de la herencia de los polimorfismos cromosómicos; 5) estudio de cromosomas supernumerarios o minicromosomas.

La electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida no desnaturalizante persigue objetivos similares a la electroforesis en gel de agarosa, pero se utiliza para la separación de fragmentos más pequeños y cuando se quiere obtener una mayor resolución. La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de poliacrilamida es un procedimiento sencillo y permite la obtención de ADN de alta pureza que puede utilizarse para aplicaciones que requieran un ADN totalmente libre de impurezas. La electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida no desnaturalizante no se utiliza para la técnica de *Southern blot*. Otra

aplicación frecuente de este tipo de electroforesis es la detección de complejos ADN-proteína en la técnica denominada EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), también denominada geles de retardo. Esta técnica se basa en el retraso que provoca en la migración de un fragmento de ADN la unión al mismo de una proteína que reconozca alguna secuencia del fragmento y se una a él de forma específica (Carey 1988, Cann 1989).

VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Las técnicas de electroforesis de ADN, en especial la electroforesis en gel de agarosa, es una técnica básica e imprescindible en cualquier laboratorio que utilice técnicas moleculares con ADN incluso en el nivel más básico. A la hora de montar un laboratorio de biología molecular lo primero que debe plantearse es la adquisición de los equipos necesarios para la realización de electroforesis en geles de agarosa. Resulta imprescindible una cámara de electroforesis con sus accesorios y una fuente de alimentación, así como un transiluminador y un sistema de fotodocumentación. Los costos de estos equipos son asequibles y no requieren de grandes inversiones.

Algunos de los componentes utilizados en las técnicas de electroforesis de ADN son tóxicos y deben tomarse precauciones especiales en su manejo:

Bromuro de etidio. El bromuro de etidio es tóxico a elevadas concentraciones debido a su capacidad mutagénica. Se debe evitar la inhalación del compuesto en estado sólido (manipularlo en campana de extracción), y se deben manejar las soluciones siempre con guantes.

Las soluciones de tinte de bromuro de etidio pueden descontaminarse de la siguiente forma: agregar agua hasta que su concentración esté por debajo de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, a esta solución añadirle 0.2 volúmenes de ácido hipofosforoso al 5% recién preparado y 0.2 volúmenes de solución fresca de nitrito de sodio 0.5 M, mezclar con cuidado y checar que el pH sea inferior a 3, dejar incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h y agregar un volumen de bicarbonato de sodio 1 M. En este momento la solución puede desecharse.

Acrilamida. La acrilamida en polvo y en solución es tóxica, y tiene la capacidad de penetrar a través de la piel. Se debe evitar la inhalación del compuesto en estado sólido (manipularla en campana de extracción), y se deben manejar las soluciones siempre con guantes. Una vez polimerizada los geles ya no resultan tóxicos, sin embargo se recomienda la utilización de guantes para su manipulación.

Luz ultravioleta. Los ojos y la piel deben protegerse adecuadamente mediante el uso de pantallas que filtren las longitudes de onda correspondientes a luz UV.

PERSPECTIVAS

Las técnicas de electroforesis de ADN son hoy en día básicas e insustituibles para cualquier trabajo en biología molecular con ácidos nucleicos, por lo que seguirán utilizándose previsiblemente durante mucho tiempo. A lo largo de los años se han ido desarrollando avances en este tipo de técnicas, como la PFGE, así como aplicaciones nuevas, como el EMSA. El continuo desarrollo de las técnicas de biología molecular hace prever que se encontrarán nuevas aplicaciones para los diferentes métodos de electroforesis de ácidos nucleicos en gel.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaij C. y P. Borst. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica and Biophysica Acta* 269: 192-200.
- Cann J. R. 1989. Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes. *Journal of Biological Chemistry* 264: 17032-17040.
- Carey J. 1988. Gel retardation at low pH resolves trp-repressorDNA complexes for quantitative study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 975-979.
- El-Osta Y. G., A. J. Hillier y M. Dobos. 2005. Construction of a combined physical and genetic map of the chromosome of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and characterization of the rRNA operons. *Microbiology* 151: 875-892.
- Fierro F., S. Gutiérrez, B. Díez y J. F. Martín. 1993. Resolution of four large chromosomes in penicillin producing filamentous fungi: The penicillin gene cluster is located on chromosome II (9.6 Mb) in *Penicillium notatum* and chromosome I (10.4 Mb) in *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and General Genetics* 241: 573-578.
- Fierro F., S. Gutiérrez, J. Casqueiro y J. F. Martín. 2001. Karyotyping of fungi by Pulsed Field Gel Electrophoresis. Págs. 105-125 En: S.G. Pandalai (ed.), *Recent Research Developments in Genetics*, vol. 1. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Kirkpatrick E. H. 1990. Overview of agarose gel properties. *Current Communications in Cell Molecular Biology* 1: 9-22.

- Orbach M. J., D. Vollrath, R. W. Davis y C. Yanofsky. 1988. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* 8:1469-1473.
- Pittet D., M. Monod, I. Filthuth, E. Frenk, P. M. Suter y R. Auckenthaler. 1991. Contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis as a powerful epidemiologic tool in yeast infections. *American Journal of Medicine*. 91: 256S-263S.
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001a. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.61-5.64
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001b. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.65-5.67
- Sambrook J. y D. W. Russell. 2001c. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., pp. 5.68-5.70
- Schwartz D. C. y C. R.Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- Sharp E. A., B. Sugden y J. Sambrook. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.
- Thorne H. Y. 1966. Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* 29: 234-239.
- Thorne H. Y. 1967. Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. *Journal of Molecular Biology* 24: 203-211.

