

Trabajo Práctico:
“DETECCIÓN DIRECTA E INDIRECTA DE ALTERACIONES GENÉTICAS RELACIONADAS
CON PATOLOGÍAS HUMANAS”

TP n°2: Visualización de productos de PCR/RFLP por Electroforesis en geles de Poliacrilamida (PAGE).

Lugar de Trabajo: Laboratorio Boccalandro

Introducción

La electroforesis es una técnica de separación (o resolución) de moléculas en una solución por aplicación de un campo eléctrico. En dicho campo, moléculas que posean igual carga eléctrica pero distinto tamaño, se moverán o “migrarán” a diferentes velocidades. Es decir, las moléculas más livianas se moverán más rápido que otras moléculas más pesadas. En ésta técnica se utiliza, en general una matriz porosa (gel), ubicada en un recipiente con electrodos (cuba) y sumergida en una solución conductora (buffer). Las mezclas de moléculas son “sembradas” dentro de la matriz, al aplicar electricidad se generará un campo eléctrico, y las moléculas se moverán a través del gel (que actúa como un tamiz) a velocidades variables (figura1).

Esta técnica es muy útil para la resolución, por ejemplo, de fragmentos de distinto tamaño de ADN, dado que los ácidos nucleicos poseen carga negativa, debido a los grupos fosfato. Ya que la carga eléctrica de los fragmentos de ADN es constante, en una electroforesis, su velocidad estará dada por su tamaño, medido en pares de bases o “pb” (figura 2).

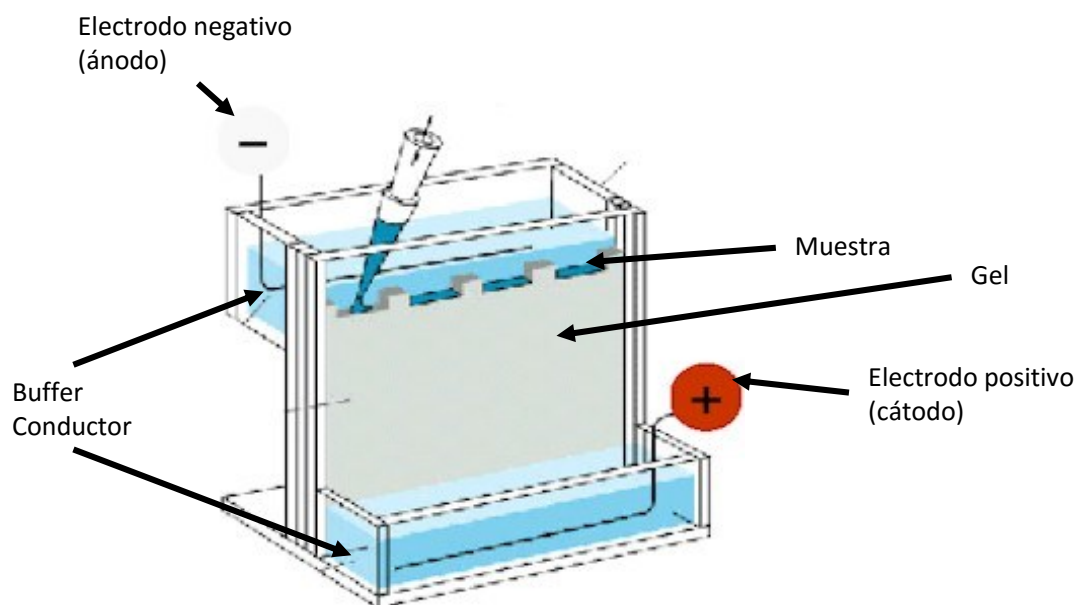


Figura 1: Cuba de electroforesis en gel

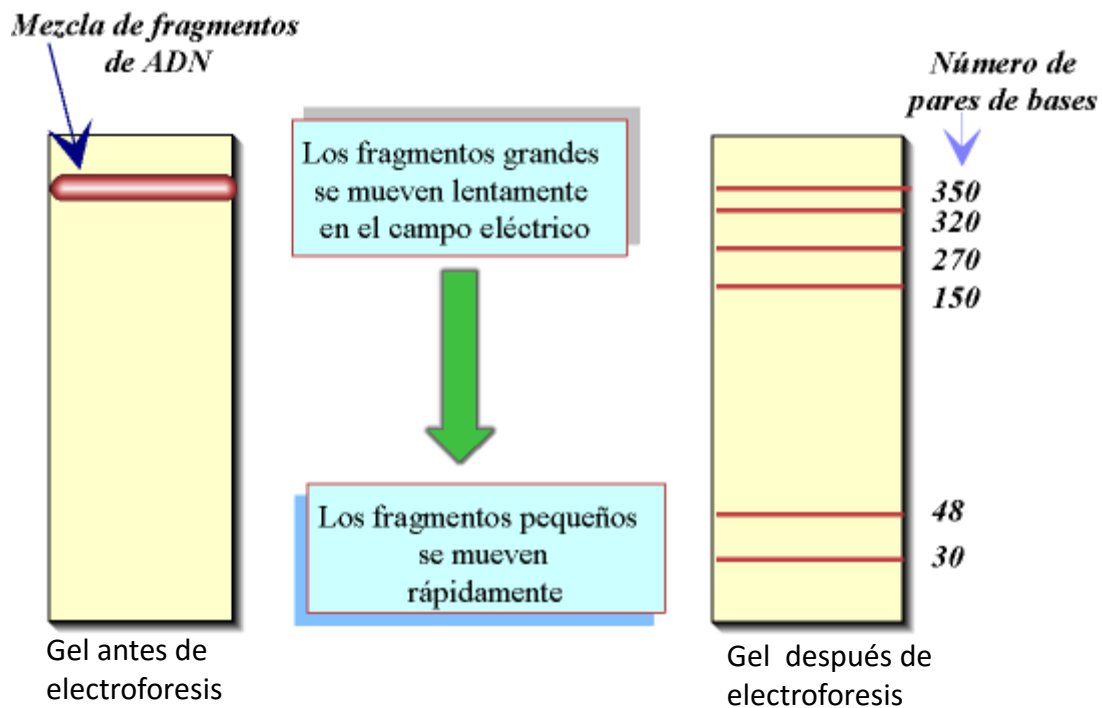


Figura 2: electroforesis de ADN

Para la separación de fragmentos de ADN, los geles más utilizados en electroforesis son dos: agarosa y poliacrilamida.

La agarosa es un polisacárido soluble en agua por encima de 65°C. Al enfriarse forma una matriz inerte, con un tamaño de poro que permite separar fragmentos de ADN entre 500pb y 20kb.

La poliacrilamida es un polímero que se prepara a partir de la polimerización de acrilamida junto con un agente entrecruzante (bisacrilamida), en presencia de un catalizador (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, abreviado TEMED). El TEMED por sí solo no es suficiente para iniciar la polimerización, por lo que es necesario la presencia de persulfato de amonio (APS), que actúa como "iniciador" de la reacción. La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) separa fragmentos más pequeños que los geles de agarosa (1 a 2000 pb, dependiendo de la concentración final de acrilamida), ya que el tamaño de poro generado es de menor tamaño que con agarosa. Esto último, confiere un mayor poder resolutivo, por lo que PAGE es la mejor opción para la separación de fragmentos de ADN con tamaños que difieren en unas pocas pares de bases.

En este práctico llevaremos a cabo una PAGE para separar los fragmentos obtenidos por PCR/RFLP obtenidos en el práctico n°2.

Preparación del gel de poliacrilamida 10%

Buffer TBE 5X	1200 μ l
Acrilamida 40%:Bisacrilamida (29:1)	1500 μ l
Agua	3300 μ l
TEMED	10 μ l
APS 25%	20 μ l

NOTA:El orden de agregado de cada uno de los reactivos es importante, en último lugar debe agregarse SIEMPRE el APS, ya que apenas éste entra en contacto con la acrilamida empieza la reacción de polimerización.

Siembra de muestras en geles

Una vez terminado el gel, se colocará éste en un soporte y se sumerge dentro de la cuba con TBE 1x (buffer conductor). Debido a que el ADN es soluble en agua e incoloro, previo a la siembra, se deberá adicionar Loading Buffer (o Buffer de Carga) al ADN.

El buffer de carga es una solución que contiene principalmente una sustancia que otorgue densidad al ADN (por ejemplo glucosa) y un colorante liviano y de carga negativa (por ejemplo azul de bromo fenol).

Preparación de muestras con Loading Buffer

ADN	4 μ l
Loading Buffer 5x	1 μ l

Se sembrarán las muestras en el gel y se realizará la corrida electroforética durante 60 minutos a 120 volts.

Visualización de resultados

Una vez terminada la electroforesis, se teñirán los geles con SYBRGreen. El SYBRGreen es un agente intercalante de ADN, de baja toxicidad y con fluorescencia verde que permite ver las bandas en el gel.

Para observar las bandas se utilizará un LAS (Sistema de Amplificación de luz). El LAS es un dispositivo que posee una cámara fotográfica sensible a fluorescencia, que nos permitirá tomar fotografías del gel y de las bandas teñidas (Figura 3).



Figura 3: LAS 4000