



## Agarose Electrophoresis of Nucleic Acids.

Created: Oct 14, 2008; Last modified: Oct 07, 2020, Version: 2.0

La electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa continua siendo una herramienta imprescindible de la biología molecular para caracterizar, identificar y aislar DNA o RNA. La electroforesis en gel de agarosa se emplea en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UASLP para visualizar la integridad de DNA genómica, para evaluar la presencia e integridad de las diferentes especies de RNA (mRNA, rRNA y tRNA) al igual que para evaluar el éxito de la amplificación lograda por reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes (RT-PCR) de punto final. Debido a que el gel de agarosa no es desnaturizante los fragmentos de menor tamaño se mueven con mayor facilidad a través de los poros de la matriz de agarosa mientras que los fragmentos grandes se enfrentan a mayor resistencia y por ende migran lentamente. Los gels de agarosa concentrados (2% a 3%) ofrecen mayor resistencia al tránsito de los ácidos nucleicos y por ende permiten lograr mayor resolución. El producto de PCR o el ácido nucleico generalmente se mezcla con buffer de carga 6x. Los buffers de carga facilitan la visualización y sedimentación del producto de PCR o de ácidos nucleicos en los pozos para lo cual emplean distintos tipos de colorantes, cada uno de ellos exhibe un patrón de migración diferente. El Xylene Cianol migra a casi la misma velocidad que un fragmento de 5 kbp, el Azul de Bromofenol migra a la misma velocidad que un fragmento de 300 bp, el Rojo Cresol a la altura de los fragmentos de 125 bp mientras que el Naranja G lo hace a alrededor de las 50 bp.

### Procedimiento

1. Calcule la concentración de agarosa requerida para la aplicación deseada en base a la siguiente tabla:

Aplicaciones de gels de agarosa a distintas concentraciones		
% Agarosa	Rango (kb)	Aplicación
0.3	60 a 5	Evaluación de la integridad de YACs o PACs.
0.5	30 a 1	Visualización de constructos artificiales.
0.7	12 a 0.8	Evaluación de la integridad de BACs.
1	10 a 0.5	Evaluación de la integridad del DNA genómico.
1.2	7 a 0.3	Propósito general, visualización de productos de PCR entre 100 y 2000 bp.
1.5	4 a 0.2	Evaluación de la integridad de mRNA o rRNA y de propósito general.
2	3 a 0.1	Tamizaje genético de fragmentos de PCR pequeños (50 bp a 200 bp).
3	< 0.1	Visualización de STRs, subtipificación con amplicones cercanos.



- Calcule las dimensiones y el volumen de gel necesario para la aplicación deseada y para el tanque de electroforesis con el cual se trabajará. La siguiente tabla se ofrece como referencia para los cassetes de electroforesis empleados con el sistema de electroforesis Gator A2 de la compañía Owl.

Cantidad de Agarosa necesaria para preparar geles del sistema Gator A2 de acuerdo al % y grosor.				
% del Gel	0.25 cm	0.5 cm	0.75 cm	1.0 cm
Volumen del Gel	125 ml	250 ml	375 ml	500 ml
0.3 %	0.375 g	0.75 g	1.125 g	1.5 g
0.5 %	0.625 g	1.25 g	1.875 g	2.5 g
0.7 %	0.875 g	1.75 g	2.625 g	3.5 g
1 %	1.25 g	2.5 g	3.75 g	5 g
1.2 %	1.5 g	3 g	4.5 g	6 g
1.5 %	1.875 g	3.75 g	5.625 g	7.5 g
2 %	2.5 g	5 g	7.5 g	10 g
3%	3.75 g	7.5 g	11.25 g	15 g

- En un matraz Erlen-Meyer de 500 mL pese la cantidad correspondiente de agarosa según el porcentaje, volumen y grosor del gel deseado.
- Agregue al matraz Erlen-Meyer el volumen de buffer de electroforesis 1x (ya sea TAE o TBE, ver tabla inferior) correspondiente al grosor del gel deseado (ver la tabla del paso #2).

Comparación de propiedades electroforéticas de los buffers TAE y TBE		
Propiedad	TAE	TBE
Aplicación común	Electroforesis preparativa	Electroforesis analítica
Resolución óptima	Fragmentos grandes (> 20 kb)	Fragmentos pequeños (< 1 kb)
Resolución	Elevada (fragmentos > 5kb)	Mediana (fragmentos < 5kb)
Fuerza iónica	Baja	Elevada
Capacidad de amortiguación pH	Baja	Elevada
Reciclabilidad	Baja ( $\leq 3$ ciclos)	Elevada ( $\leq 6$ ciclos)
Mobilidad de DNA	Alta, bandas borrosas	Baja, bandas compactas

- Agregue una barra magnética al matraz y mezcle vigorosamente con el agitador magnético.



- Coloque el matraz (con todo y barra magnética) en el horno microondas y caliente a potencia total durante 1 o 2 minutos evitando en lo posible la ebullición de la agarosa.
- Retire el matraz del horno microondas con el guante de protección térmica y colóquelo nuevamente sobre el agitador magnético hasta que disminuya su temperatura a 50°C.
- Agregue la cantidad correspondiente de Bromuro de Etidio al gel de agarosa (a razón de 5 µL de Bromuro de Etidio por cada 100 mL del gel). Mezcle vigorosamente con el agitador magnético.
- Permítasele al matraz enfriarse durante tres minutos y luego vacíe su contenido sobre el cassette de electroforesis previamente sellado con cinta adhesiva o con los sellos de acrílico originales. Coloque los peines necesarios en el gel.
- Permítasele cuajar por completo durante al menos 30 minutos protejiéndolo de corrientes de aire directas con otro cassette de electroforesis o con papel aluminio. Evite el uso de toallas de papel cerca de los geles de agarosa para evitar cotaminarlo con fibras que exhiban fluorescencia ultravioleta.
- Prepare 2 litros de buffer de electroforesis para el tanque (TAE o TBE) y añada 100 µL de Bromuro de Etidio (también a razón de 5 µL de Bromuro de Etidio por cada 100 mL de buffer). Tape bien con parafilm, mezcle por inversión o con barra magnética sobre el agitador magnético y etiquete claramente la leyenda “*TBE/TAE con Bromuro de Etidio*”.
- Después de los 30 minutos, retire la cinta adhesiva del cassette y colóquelo dentro del tanque de electroforesis. Vierta la cantidad apropiada de buffer de electroforesis (del mismo tipo empleado para preparar el gel) con bromuro de etidio. El buffer solamente deberá cubrir discretamente (no más de 1 mm de altura) a los pocillos del gel).
- Retire los peines del gel cuidadosamente para evitar romper los pocillos.
- Cargue el gel con producto de PCR o ácido nucleico tomando en cuenta el volumen máximo recomendado para cada peine, tal cual se expone en la siguiente tabla.

Dimensión, número de catálogo y volumen de carga de los distintos peines disponibles para el sistema Gator A2.								
Catálogo	Formato	Dimensiones del diente			Volumen de carga (según grosor del gel)			
		Número	Grosor	Ancho	0.25 cm	0.5 cm	0.75 cm	1 cm
A2-16D	Estandar	16	1.5	10.5 mm	12 µL	41 µL	70 µL	99 µL
A2-24D	Estandar	24	1.5	6.5 mm	7 µL	25 µL	43 µL	61 µL
A2-36D	Estandar	36	1.5	3.5 mm	4 µL	15 µL	25 µL	35 µL
A2-RL-18D	Rapid Load	18	1.5	7.2 mm	8 µL	28 µL	49 µL	69 µL

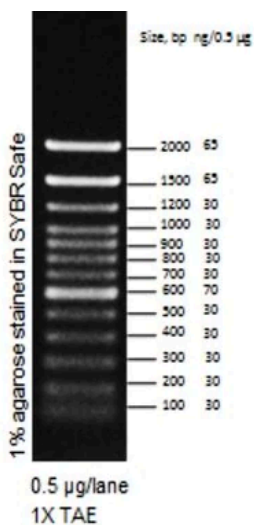


15. Enjuague todos los componentes de electroforesis al terminar la corrida.
16. Reutilice el buffer de electroforesis o elimínelo hacia un matraz Kitasato empleando el sistema de boma de vacío para entonces proceder con el protocolo de “*Descontaminación de Bromuro de Etidio*”.

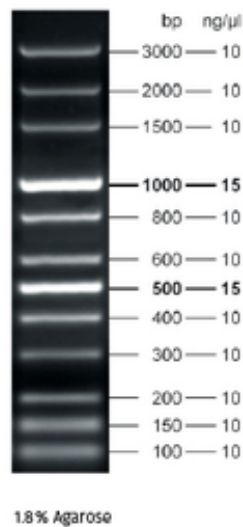
## Notas

1. La temperatura ambiente del laboratorio deberá disminuirse (cerca de 22°C) durante el verano con el objeto de evitar la distorsión del frente de migración del ácido nucleico en el gel.
2. No se recomienda limpiar o secar los tanques y cassetes de electroforesis con toallas desechables de papel tipo Sanitas (o incluso emplearlas en los alrededores del área de electroforesis y fotodocumentador) debido a que liberan fibras fluorescentes bajo iluminación ultravioleta.

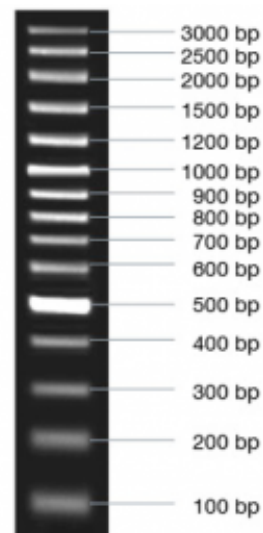
## DNA molecular markers commonly used at our laboratory



*Invitrogen*



*Jena Bioscience*  
Cat No. 15628019



*Vivantis*  
Cat. No. M-203S7

## Referencias



1. Current Protocols in Molecular Biology, Appendix 2, A.2.5, Supplement 40, Frederick M. Ausubel et al. 2003.
2. Wikipedia contributors. TE Buffer. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Jun 08, 2008, at 04:15 UTC. Available at: [http://en.wikipedia.org/wiki/TE\\_buffer](http://en.wikipedia.org/wiki/TE_buffer)
3. Zbio.net Classical and Molecular Biology. Compound Solutions. Jun 08, 2008, at 05:34 UTC. Available at: [http://molbiol.ru/eng/protocol/01\\_07.html](http://molbiol.ru/eng/protocol/01_07.html)

## Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Included images of molecular weight ladders commonly used at our lab (Invitrogen 100 bp DNA Ladder Cat. No. 15628019/15628050, Jena Bioscience Mid Range DNA Ladder 100 bp to 3 kb linear scale ready-to-use, orange / blue loading buffer Cat. No. M-203S/L) and Vivantis Cat. No. NL0401.

