



Preparación de solución de bromuro de etidio para visualizar productos de PCR

Creado: Oct 31, 2023; Última modificación: Oct 31, 2023, Versión: 1.0

El bromuro de etidio (bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridina, C₂₁H₂₀BrN₃) es un agente intercalante utilizado como marcador fluorescente en técnicas de biología molecular basadas en ácidos nucleicos como la electroforesis en gel de agarosa. Erróneamente abreviado "EtBr" (bromoetano), se utilizó ampliamente con el nombre de homidio durante la década de 1950 en medicina veterinaria para tratar la tripanosomiasis bovina (detiene la replicación del cinetoplastoide al cambiar la conformación del DNA a DNA-Z). Cuando se expone a la luz ultravioleta (la máxima de absorción es de 210 y 285 nm), emite fluorescencia naranja a marrón rojiza (máxima de emisión de 605 nm) que se intensifica casi 20 veces después de unirse al DNA. El DNA puede fotografiarse en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mediante iluminación ultravioleta (>2500 μW/cm²). Por lo general, se utiliza un transiluminador UV para este propósito. El bromuro de etidio se une al DNA por lo que se considera altamente tóxico, mutágeno y potencialmente cancerígeno o teratógeno (aunque no hay evidencia científica de esos efectos). La exposición al bromuro de etidio puede ocurrir por inhalación, ingestión o absorción cutánea. La intoxicación aguda por bromuro de etidio se caracteriza por irritación de la boca, las vías respiratorias superiores, la piel y los ojos. Es obligatorio el empleo de guantes de nitrilo durante su preparación y manipulación ya que proporcionan mayor resistencia que el látex. Para visualizar los fragmentos de DNA en gel de agarosa se puede añadir bromuro de etidio al buffer de electroforesis hasta una concentración final de 0,5 μg/ml. Dado que nuestro laboratorio utiliza geles de electroforesis de agarosa de gran formato (25 x25 cm) y un volumen total de tanque de 2 litros, es **EXTREMADAMENTE IMPORTANTE** que todos los buffers de electroforesis se descontaminen con carbón activado antes de descartarlos por el desagüe. El filtrado de soluciones acuosas teñidas con bromuro de etidio (buffer de electroforesis) a través de carbón activado es un método de descontaminación sencillo y eficaz. Una vez filtrado, el buffer puede verse por el desagüe mientras que el carbón activado se elimina como residuo tóxico. Esto reduce el peso y volumen de los residuos que deben continuar considerándose tóxicos (el carbón activado).

Procedimiento

1. Colóquese el equipo de protección personal correspondiente: bata de laboratorio abotonada, guantes de nitrilo, respirador N95 y goggles.
2. Recupere el frasco de bromuro de etidio en polvo (Sigma E7637-1G) del armario azul ubicado en el almacén.
3. Pese 10 mg de bromuro de etidio en polvo en la balanza analítica marca Ohaus modelo Adventurer ubicada en el área de biología molecular.
4. Coloque los 10 mg de bromuro de etidio en un criovial de 1.8 ml.
5. Añada 1 ml de dH₂O, tape y agite en vortex durante 5 minutos.



6. Forre el criovial con cinta de aluminio autoadhesiva para proteger al bromuro de etidio de la luz (ver imagen inferior).
7. Agregue etiqueta autoadhesiva encima del aluminio con la leyende “*Bromuro de etidio 10 mg/ml TÓXICO*”.



8. Coloque el criovial forrado de aluminio en una caja también protegida de la luz (ver imagen inferior).



9. Añadir 5 µl de esta solución de 10 mg/ml por cada 100 ml de gel o buffer de electroforesis.



Notas

1. Siga las recomendaciones para descontaminación de bromuro de etidio del buffer de electroforesis asentadas en el siguiente protocolo
http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Gral_EtBr_Decon_ENG.pdf.

Referencias

1. Sabnis RW (2010). Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Application. Hoboken, NJ: Wiley. ISBN 978-0-470-40753-0.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470586242>
2. Borst P (November 2005). "Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started". IUBMB Life. 57 (11): 745–747.
<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1080/15216540500380855>
3. Olmsted J, Kearns DR (August 1977). "Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids". Biochemistry. 16 (16): 3647–3654
<https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/bi00635a022>

Historial de cambios

- 1.0 Documento original.

