EDVOTEK®

THE BIOTECHNOLOGY EDUCATION COMPANY®

Edvo-Kit n° 101

Edvo-Kit n° 101

# Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa

## Objetivo experimental:

El objetivo de este experimento consiste en desarrollar una comprensión básica de la teoría de la electroforesis y en adquirir práctica con los procesos de separación de diversas moléculas a través de la electroforesis horizontal sobre gel.

**Consultar instrucciones de almacenaje en la página 3.**

1.800.EDVOTEK • Fax 202.370.1501 • www.edvotek.com • info@edvotek.com

101.150119

# Contenido


| | Página |
|---|---|
| Material experimental | 3 |
| Material adicional requerido | 3 |
| Contexto | 4 |
| Presentación del experimento | |
| Dispositivo experimental | 5 |
| La electroforesis en gel de agarosa | 7 |
| Preguntas de estudio | 9 |
| Guía del profesor | 10 |
| Preparativos | 11 |
| Resultados y análisis del experimento | 12 |
| Preguntas de estudio y respuestas | 13 |
| Apéndices | 14 |
| A Guía de resolución de problemas | 15 |
| B Preparación de lotes de gel de agarosa | 16 |


Fichas con instrucciones de seguridad disponibles en nuestra página web:
**www.edvotek.com/safety-data-sheets**

EDVOTEK and The Biotechnology Education Company are registered trademarks of EDVOTEK, Inc.
Ready-to-Load, QuickStrip, DuraGel, and UltraSpec-Agarose are trademarks of EDVOTEK, Inc.



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# Material experimental

### MUESTRAS DE ELECTROFORESIS READY-TO-LOAD™

**Almacenar inmediatamente las muestras QuickStrip™ en un refrigerador.**
**Los demás componentes se pueden conservar a temperatura ambiente.**

**El experimento n°101 está previsto para 8 geles.**

Almacenar inmediatamente las muestras QuickStrip™ en un refrigerador. Los demás componentes se pueden conservar a temperatura ambiente.

| **Componentes (formato QuickStrip™)** | | **(✓)** |
|---|---|---|
| A | Naranja | ❑ |
| B | Morado | ❑ |
| C | Rojo | ❑ |
| D | Azul 1 | ❑ |
| E | Mezcla de colorante | ❑ |
| F | Mezcla de colorante azul (Azul 1 + Azul 2) | ❑ |

### REAGENTS & SUPPLIES

- UltraSpec-Agarose™ ❑
- Tampón de electroforesis (50x) ❑
- Solución de carga de colorante ❑
- Pipeta de 1 ml ❑
- Micropipetas de transferencia ❑

# Material adicional requerido

- Equipo de electroforesis horizontal
- Fuente de corriente continua
- Micropipetas automáticas con puntas
- Balanza
- Microondas, placa de calentamiento o estufa
- Pro-pipeta
- Matraces o vasos de precipitado de 250 ml
- Guantes anticalor
- Lentes protectoras y guantes de laboratorio desechables
- Sistema de visualización (transiluminador de luz blanca)
- Agua destilada o desionizada

Los componentes del kit tienen fines exclusivamente educativos. No deben jamás utilizarse para pronunciar diagnósticos o con fines médicos y no deben ser ingeridos por hombres ni animales.



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# Contexto

La electroforesis en gel de agarosa se utiliza comúnmente para separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma. Se trata de un medio de separación especialmente eficaz para las biomoléculas cargadas como el ADN, el ARN y las proteínas.

A pesar de que la electroforesis en gel de agarosa sea una técnica simple y fácil, posee dotes de separación eficaces. El gel se fabrica disolviendo polvo de agarosa en una solución tampón hirviente. A continuación, se deja enfriar la solución a 55°C y se vierte en un soporte, donde se solidifica. Se sumerge después el soporte en un equipo de electroforesis de electrodos que contiene solución tampón.

Para preparar las muestras para la electroforesis, éstas se mezclan con componentes que les agregan densidad, como el glicerol o la sacarosa. Estos proporcionan a las muestras más densidad que la del tampón de electroforesis. Las muestras pueden entonces colocarse por medio de una micropipeta o pipeta de transferencia en las rendijas visibles en el gel con la ayuda de una plantilla. Por su densidad, las muestras se sumergen en la solución tampón y permanecen en los pocillos.

El equipo de electroforesis se conecta a una fuente de corriente continua directa y se somete a tensión. Las moléculas cargadas contenidas en las muestras penetran en los capilares del gel. Las moléculas de carga neta negativa migran hacia el electrodo positivo del aparato de electroforesis (ánodo), mientras que las moléculas de carga neta positiva migran hacia el electrodo negativo (cátodo). Dentro de ciertos márgenes, cuanto más fuerte sea el campo eléctrico, mas rápido migran las moléculas. El tampón sirve a la vez para conducir la electricidad y para controlar el pH. Efectivamente, el pH tiene una influencia sobre la carga y la estabilidad de las moléculas biológicas.

La agarosa es un polisacárido derivado del agar. En este experimento utilizamos Ultra-Spec AgaroseTM. Este componente se constituye de una mezcla de agarosa y de hidrocoloides que hacen que el gel sea transparente y resistente. El gel contiene capilares microscópicos que actúan como "tamices" moleculares. Las propiedades del gel determinan la velocidad de migración de las moléculas: las pequeñas moléculas migran más rápidamente que las grandes. Además, las moléculas de misma masa y carga pueden tener formas distintas: las de forma más compacta (las formas redondeadas son más compactas que las formas alargadas) migran más rápidamente.

Factores como la carga, el tamaño y la forma de las moléculas, así como las características del tampón de electroforesis, la concentración del gel y la potencia eléctrica, tienen un impacto sobre la movilidad de las moléculas en el gel. Entre las moléculas de masa y forma molecular semejante, las más cargadas migrarán con mayor rapidez. Por otra parte, distintas moléculas interactúan en medida distinta con la agarosa. Cuanto menos simple sea la interacción, más lenta es la migración de las moléculas.

En este experimento, someteremos diversas muestras a la electroforesis mediante gel de agarosa y observaremos la velocidad y la dirección de su migración. Los colorantes A, B, C y D tienen cargas negativas y pH neutro. Sin embargo, estas moléculas difieren por su estructura, composición química y carga. El colorante F tiene una carga neta positiva y migrará por tanto en dirección opuesta a la de los demás colorantes. Además, se colocará una combinación de colorantes en un mismo pocillo en el transcurso de este experimento. Esto mostrará el poder de separación de mezclas complejas de colorantes en componentes individuales de la electroforesis en gel de agarosa.



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# Presentación del experimento

## OBJETIVO EXPERIMENTAL:

El objetivo de este experimento consiste en desarrollar una comprensión básica de la teoría de la electroforesis y en adquirir práctica con los procesos de separación de diversas moléculas a través de la electroforesis horizontal sobre gel.

## SEGURIDAD DE LABORATORIO

Lleve guantes y lentes protectoras.

1. El uso corriente de guantes y lentes protectoras es una buena práctica de laboratorio.
2. Se debe ser prudente al utilizar aparatos para calentar o fundir reactivos.
3. NO PIPETEAR REACTIVOS CON LA BOCA - UTILIZAR LAS PROPIPETAS.
4. Ser prudente al utilizar equipos eléctricos en el laboratorio.
5. Siempre lavarse cuidadosamente las manos con jabón y agua tras haber tocado reactivos o materiales biológicos en el laboratorio.

## CUADERNOS DE LABORATORIO

Los científicos guardan constancia de todo lo que sucede durante un experimento: las condiciones experimentales, sus ideas, sus observaciones y, por supuesto, todos los datos que resultan del experimento. Hoy, tomará apuntes sobre su experiencia en un cuaderno de laboratorio o en una hoja de papel.

### Antes de comenzar el experimento:

- Lea atentamente la introducción y el protocolo. Utilice esa información para formar una hipótesis experimental.
- Prevea los resultados del experimento.

### Durante el experimento:

- Apunte sus observaciones.

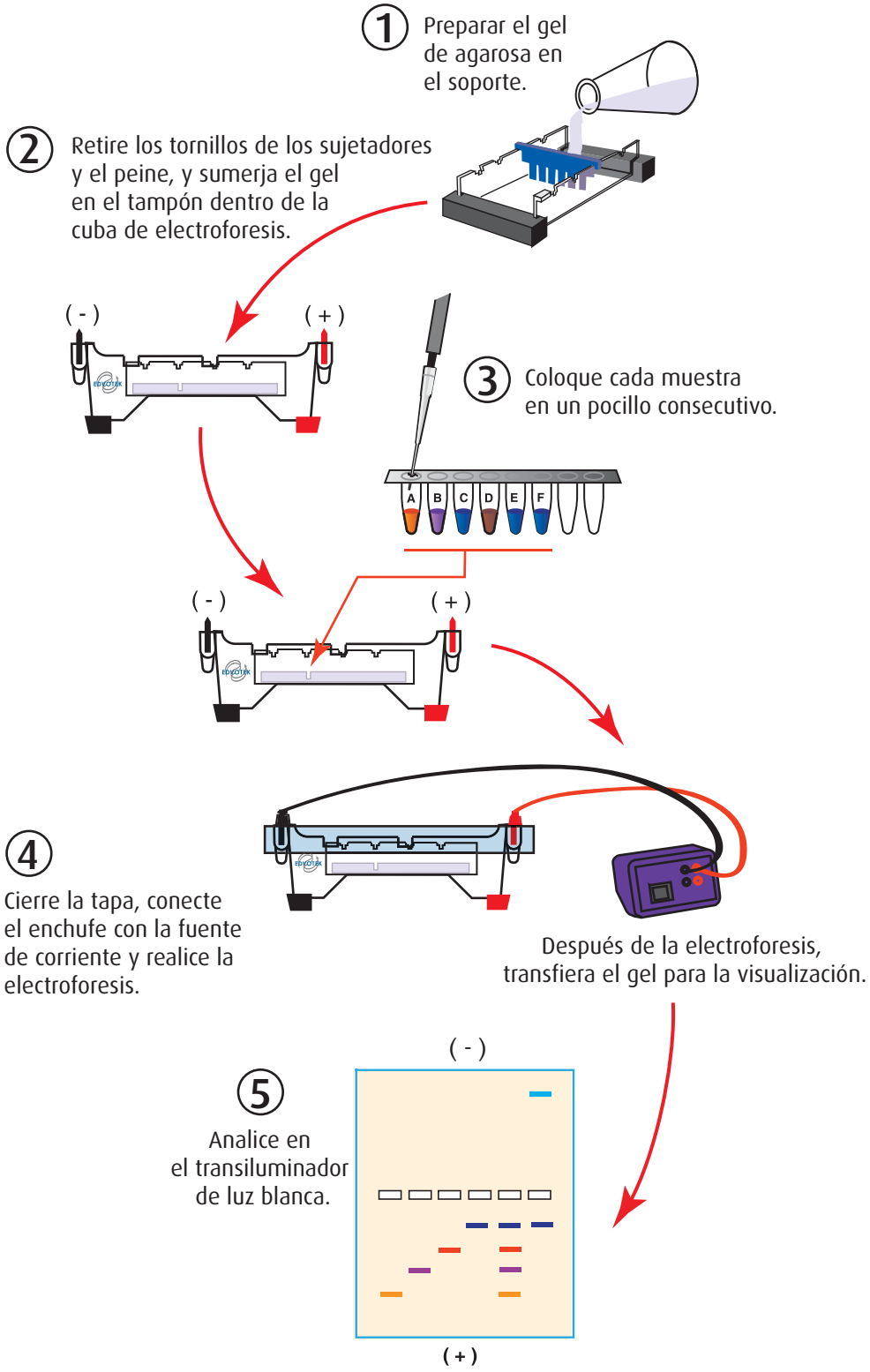
### Después del experimento:

- Interprete los resultados – confirman o invalidan éstos su hipótesis?
- Si debiera repetir el experimento, que cambiaría? Revise su hipótesis tomando en cuenta estos cambios.



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

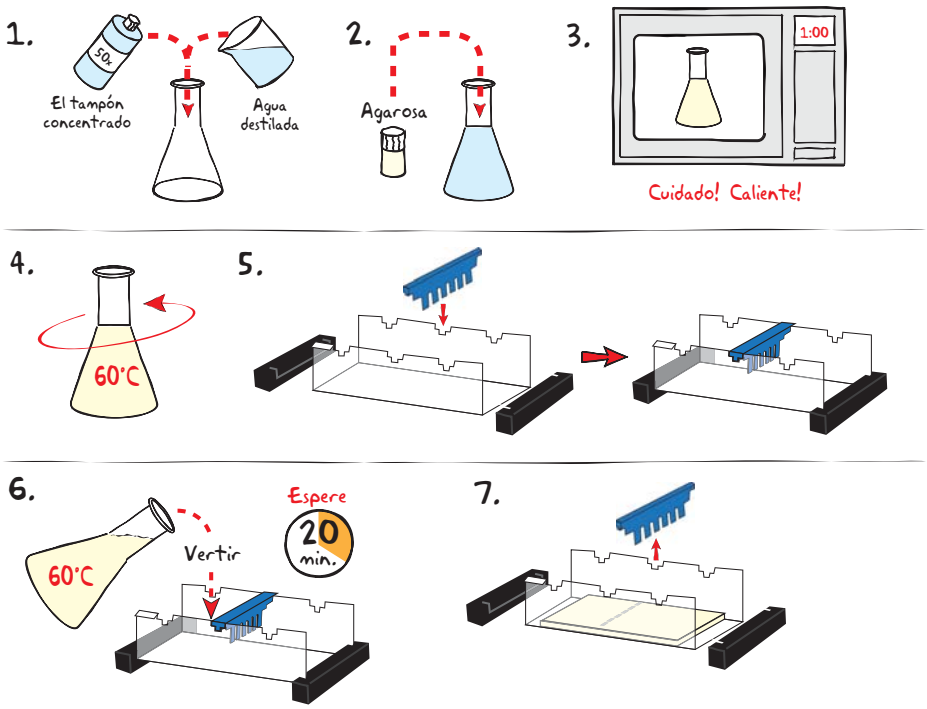
## Dispositivo experimental






Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# La electroforesis en gel de agarosa




**IMPORTANTE:**
**Este experimento requiere gel de 7x10 ou 7x14 cm. Colocar el molde (peine) en la ranura central.**

Si tiene conocimientos limitados sobre la preparación del gel de agarosa y la realización de la electroforesis, consulte instrucciones detalladas y otros recursos útiles en **www.edvotek.com**

**Lleve guantes y lentes protectoras.**

1. **DILUIR** el tampón concentrado (50x) en agua destilada para obtener tampón 1x (ver Tabla A).
2. **MEZCLAR** el polvo de agarosa con el tampón 1x en un matraz de 250 ml (ver Tabla A).
3. **DISOLVER** el polvo de agarosa, poniendo la solución a hervir. **CALENTAR** la solución en el microondas durante 1 minuto a alta temperatura. **RETIRAR** con cuidado el matraz del microondas y **MEZCLAR** la solución agitando con cuidado el matraz. Continuar **CALENTANDO** la solución por periodos de 15 minutos hasta que la agarosa esté completamente disuelta (la solución debe tener un color claro como el agua).
4. Dejar **ENFRIAR** la agarosa hasta 60°C agitando con cuidado el matraz para permitir una disipación homogénea del calor.
5. Mientras la agarosa se enfría, **CERRAR** el soporte por medio de los tornillos de caucho de los sujetadores. **SITUAR** el molde (peine) en la ranura central.
6. **VERTIR** la solución de agarosa enfriada en el soporte. El gel debería solidificarse al cabo de veinte minutos máximo. El gel se reafirma y se vuelve menos transparente al solidificarse.
7. **RETIRAR** los tornillos de los sujetadores y el peine. Al quitar el peine, tenga cuidado de no estropear los pocillos.

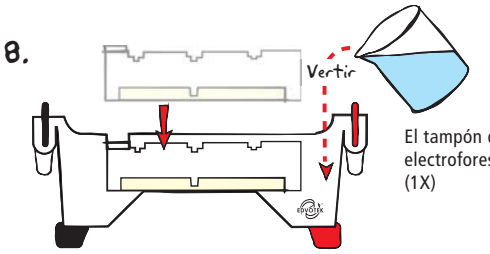
Tabla A — Gel Individual UltraSpec-Agarose de 0,8%

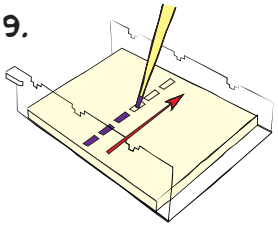
| Talla del molde de gel | 50x Tampón concentrado | + Agua destilada | + Cantidad de agarosa | = Volumen total |
|---|---|---|---|---|
| 7 x 7 cm | 0,6 ml | 29,4 ml | 0,23 g | 30 ml |
| 7 x 10 cm | 1,0 ml | 49,0 ml | 0,39 g | 50 ml |
| 7 x 14 cm | 1,2 ml | 58,8 ml | 0,46 g | 60 ml |



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

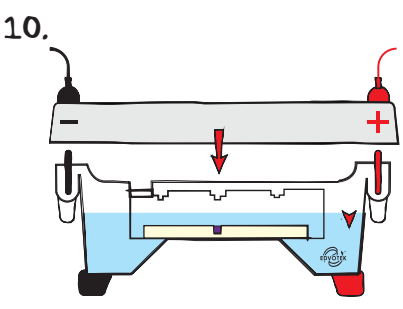
## La electroforesis en gel de agarosa

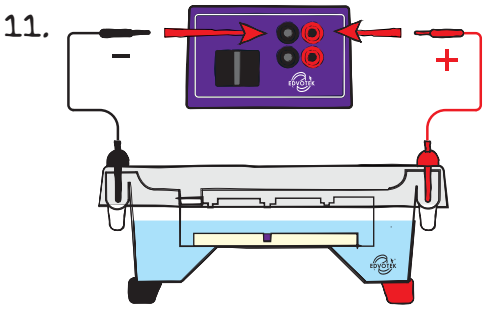



**Recuerde:**

Antes de depositar las muestras, asegúrese de que el gel esté correctamente orientado dentro de la cuba del aparato.



**Lleve guantes y lentes protectoras.**

8. **METER** el gel (soporte) en la cuba de electroforesis. **CUBRIR** el gel con el tampón de electroforesis 1x (ver volúmenes recomendados en la Tabla B). El gel debe estar completamente sumergido.
9. **AGUJEREAR** el envoltorio del QuickStrip™ con la punta de una pipeta. **DEPOSITAR** las muestras (35 - 38 µL) en los pocillos en el orden especificado en la Tabla 1.
10. **CERRAR** la tapa de seguridad. **VERIFICAR** que el gel esté situado en la dirección correcta.
11. **CONECTAR** los enchufes con la fuente de corriente y **REALIZAR** la electroforesis (ver duraciones y voltajes en la Tabla C).
12. Una vez que haya completado la electroforesis, **RETIRE** el gel y el soporte de la cuba de electroforesis y **VISUALICE** el gel de agarosa.

**NOTA:** Los colorantes no necesitan ser teñidos. Analice y documente los resultados inmediatamente tras haber completado la electroforesis. Los colorantes se difundirán y a continuación desaparecerán del gel.

**Tabla 1 : Carga del gel**

| | | |
|---|---|---|
| 1 | Tubo A | Naranja |
| 2 | Tubo B | Morado |
| 3 | Tubo C | Rojo |
| 4 | Tubo D | Azul 1 |
| 5 | Tubo E | Mezcla de colorante |
| 6 | Tubo F | Mezcla de colorante azul (Azul 1 + Azul 2) |

**Tabla B** — Tampón de electroforesis 1x (tampón de cubeta)

| Talla del soporte de gel | Volumen total necesario | Dilución: 50x Tampón concentrado | + Agua destilada |
|---|---|---|---|
| M6+ | 300 ml | 6 ml | 294 ml |
| M12 | 400 ml | 8 ml | 392 ml |
| M36 | 1000 ml | 20 ml | 980 ml |

**Tabla C** — Duración y voltaje (gel de agarosa de 0,8%)

| | Tipo de electroforesis: M6+ | M12 et M36 |
|---|---|---|
| Voltios | Min / Max | Min / Max |
| 150 | 15/20 min | 25 / 35 min |
| 125 | 20/30 min | 35 / 45 min |
| 75 | 35 / 45 min | 60 / 90 min |



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# Preguntas de estudio

1. En función de qué parámetros separa las moléculas la electroforesis mediante gel de agarosa?
2. Explique la migración en función de la carga.
3. Que conclusión se puede sacar de los resultados de la muestra F?
4. Porqué añadimos glicerol a las soluciones de muestra antes de depositarlas en los pocillos?
5. Que sucedería si colocásemos tampón en lugar de agua destilada en la solución de la cuba o en la del gel?



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# Guía del profesor

## PREPARATIVOS QUE DEBE REALIZAR EL PROFESOR ANTES DEL EXPERIMENTO:

Este apartado explica los preparativos de laboratorio recomendados y su duración aproximada.

| Lo que hay que hacer : | Cuándo : | Duración : |
|---|---|---|
| Preparar los QuickStrips™. | Como máximo un día antes del experimento. | 40 min. |
| Preparar el tampón TAE diluido | | |
| Preparar la mezcla de agarosa y verter el gel | | |



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

## Preparativos previos

### ELECTROFORESIS MEDIANTE GEL DE AGAROSA

Este experimento requiere un gel de agarosa de 0,8% por cada grupo de estudiantes. Para obtener mejores resultados, recomendamos la utilización de 7x14 cm de gel y la colocación del molde (peine) en la ranura central. Podrá decidir de preparar los geles en adelanto o permitir a los alumnos prepararlos ellos mismos. Esta etapa tardará de 30 a 40 minutos.

**Preparación individual de gel:**

Cada grupo de estudiantes puede verter su propio gel antes de realizar el experimento. Ver la descripción del dispositivo experimental. Los alumnos necesitarán tampón concentrado 50X, agua destilada y agarosa en polvo.

**Preparación de lotes de gel:**

Para ahorrar tiempo, se puede preparar de antemano una cantidad mayor de solución de agarosa y repartir a continuación en clase. Ver Apéndice B.

**Preparación de geles por adelantado:**

Los geles se pueden preparar de antemano y conservar para posterior uso. Los geles solidificados pueden conservarse en el refrigerador, bañados en tampón, durante un máximo de dos semanas.

No dejar que los geles se congelen a - 20°C porque se estropearían.

Los geles que hayan sido retirados de los soportes para su almacenaje deben ser fijados de nuevo al soporte antes de uso mediante algunas gotas de agarosa fundida. Esto impedirá que se deslicen en el soporte y las cubas.

**NOTA:**
La precisión del pipetaje es indispensable para maximizar el éxito del experimento. Los experimentos de la Serie 100 de EDVOTEK están diseñados para alumnos que ya han aprendido técnicas de micropipetaje y de electroforesis mediante gel de agarosa.

Si los alumnos no saben utilizar micropipetas, recomendamos realizar Cat. nº S-44, Bases del Micropipetaje o Cat. nº S-43, DNA DuraGelTM antes de probar este experimento de nivel más avanzado.

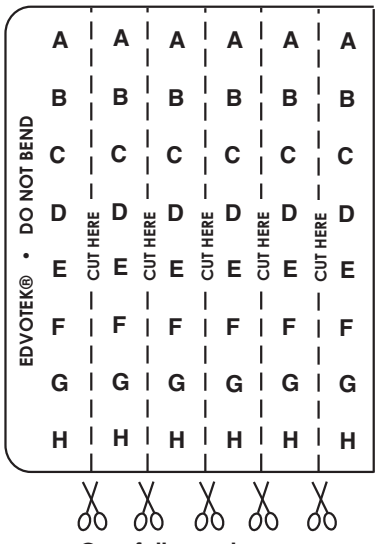
**PARA LA ELECTROFORESIS**
**Cada grupo de alumnos debe tener :**
- Tampón concentrado 50x
- Agua destilada
- UltraSpec-Agarose™
- Muestras QuickStrip™

### LA PREPARACION DE LOS QUICKSTRIPS™

Los tubos de QuickStrip™ incluyen un conjunto de placas de microtitraje en un embalaje de protección. Cada pocillo contiene muestras separadas de colorante.

Con tijeras, divida cuidadosamente el conjunto de tubos en bandas individuales recortando cada fila (consulte el esquema adjunto). Tenga cuidado de no estropear la capa protectora al separar las muestras.

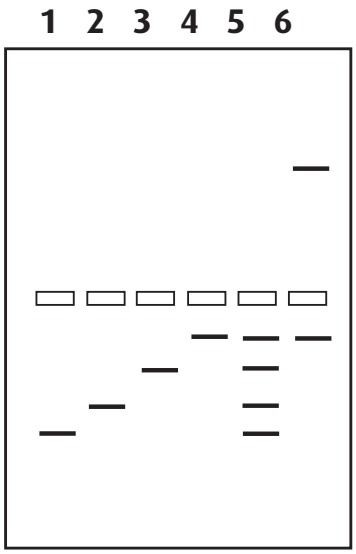
Cada grupo recibirá un conjunto de tubos. Recuerde a los alumnos de golpear ligeramente los tubos antes de cargar el gel con el fin de recoger la muestra en la parte inferior del tubo.






Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

## Resultados y análisis del experimento




| Tabla de resultados | |
|---|---|
| 1 | Naranja |
| 2 | Morado |
| 3 | Rojo |
| 4 | Azul 1 |
| 5 | Mezcla de colorante |
| 6 | Mezcla de colorante azul (Azul 1 + Azul 2) |

En el esquema adjunto, las posiciones relativas de los colorantes han sido respetadas pero no están representadas a escala.


Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

## Preguntas de estudio

1. **En función de qué parámetros separa las moléculas la electroforesis mediante gel de agarosa?**

   El gel de agarosa separa las moléculas en función de su tamaño, su carga y su forma.

2. **Explique la migración en función de la carga.**

   Las moléculas de carga negativa migran hacia el electrodo positivo; las moléculas de carga positiva migran hacia el electrodo negativo.

3. **Que conclusión se puede sacar de los resultados de la muestra F?**

   El color azul no tiene nada que ver con la carga. Azul 2 tiene carga positiva mientras que Azul 1 tiene carga negativa.

4. **Porqué añadimos glicerol a las soluciones de muestra antes de depositarlas en los pocillos?**

   El glicerol proporciona densidad a las muestras, de tal modo que éstas atraviesan la solución tampón en los pocillos.

5. **Que sucedería si colocásemos tampón en lugar de agua destilada en la solución de la cuba o en la del gel?**

   El agua destilada no contiene ningún ion. La conductividad de los fluidos requiere iones. Por lo tanto, la migración de moléculas a través del gel también requiere iones.



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# Apéndices

A Guía de solución de problemas

B Preparación de lotes de gel de agarosa

Fichas con instrucciones de seguridad disponibles en nuestra página web :
**www.edvotek.com/safety-data-sheets**



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# Apéndice A
## Guía de solución de problemas

| PROBLEMA : | CAUSA : | SOLUCION : |
|---|---|---|
| **Las bandas no se ven en el gel.** | El gel no ha sido preparado correctamente. | Asegurarse que el tampón de electroforesis ha sido correctamente diluido. |
| | El equipo de electroforesis o la fuente de corriente no funcionan correctamente. | Contactar con el fabricante del equipo de electroforesis o de la fuente de corriente. |
| **Las bandas siguen sin verse en el gel.** | Los colorantes deberían migrar al menos 3,5 cm (soporte de 7x7 cm), y 6 cm (soporte de 7x14 cm) con respecto de los pocillos. | Asegurarse de dejar avanzar el gel al menos 6 cm (cerca de una hora a 125 V). |
| **No hay separación entre las bandas.** | Un gel de concentración errónea ha sido utilizado para realizar la electroforesis. | Asegurarse de preparar el gel de agarosa de concentración adecuada. Las muestras Ready-to-LoadTM, que sirven de referencia, deben ser analizadas con gel de agarosa al 0,8%. |
| **No se ve el colorante de carga positiva en el gel.** | El colorante se ha salido del gel. | El peine no ha sido colocado en la posición correcta. Tenga cuidado de colocar el peine en las ranuras situadas en el centro del soporte. |
| **No hay suficiente muestra en el QuickStrip.** | El QuickStrip está seco. | Añadir 40 µL de agua, pipetear con cuidado de arriba a abajo para mezclar antes de cargar. |



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119

# Apéndice B
## Preparación de lotes de gel de agarosa

Para ahorrar tiempo, se puede preparar una cantidad más grande de solución de agarosa de antemano y se puede repartir a continuación en clase. El tampón diluido que no ha sido utilizado podrá servir posteriormente y la solución de gel de agarosa solidificada se puede volver a fundir.

### Lote de tampón de electroforesis

La preparación de una cantidad (lote) de 3 litros de tampón de electroforesis 1x viene detallada en la Tabla D.

Tabla D — Preparación de un lote de tampón de electroforesis

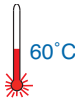
| Tampón concentrado 50x | + | Agua destilada | Volumen total requerido |
|---|---|---|---|
| 60 ml | | 2940 ml | 3000 ml (3 L) |

### Lote de geles de agarosa (0,8%)

La preparación de una cantidad (lote) de gel de agarosa à 0,8% está detallada en la Tabla E.

**Nota:**
El UltraSpec-Agarose™ del kit normalmente viene etiquetado. Lea atentamente la etiqueta. Si la cantidad de agarosa no está especificada o el cierre de la botella de plástico está roto, pese la agarosa para asegurarse de utilizar la cantidad adecuada.

1. Utilizar un frasco de 500 ml para preparar el gel diluido.
2. Verter 3,0 g de UltraSpec-AgaroseTM en la solución de gel. Agitar con cuidado para eliminar grumos.
3. Con un rotulador, indicar el volumen de concentración de la solución en el frasco.
4. Calentar la solución de agarosa, según las instrucciones del apartado sobre la preparación individual de gel. La duración de calentamiento varía en función del volumen total de solución tampón.
5. Dejar enfriar la solución de agarosa a 60°C girando con cuidado el frasco con el fin de que el calor se disipe uniformemente. Si ha habido evaporación, añadir agua destilada para mantener el volumen de concentración especificado sobre el frasco en la etapa 3.




6. Distribuir el volumen necesario de solución de agarosa enfriada para la fundición de geles individuales. Prever 30 ml para soportes de 7x7 cm, 50 ml para soportes de 7x10 cm, y 60 ml para soportes de 7x14 cm.
7. Dejar que el gel termine de solidificarse. Se volverá más firme y frío al cabo de una veintena de minutos. Preparar finalmente el gel para la realización de la electroforesis.

Tabla E — Preparación de un lote de UltraSpec-Agarose a 0,8%

| Cantidad de Agarosa (g) | + | 50x Tampón Concentrado (ml) | + | Agua Destilada (ml) | Volumen total (ml) |
|---|---|---|---|---|---|
| 3.0 | | 7,5 | | 382,5 | 390 |



Duplication of any part of this document is permitted for non-profit educational purposes only. Copyright © 1989-2016 EDVOTEK, Inc., all rights reserved. 101.160119