

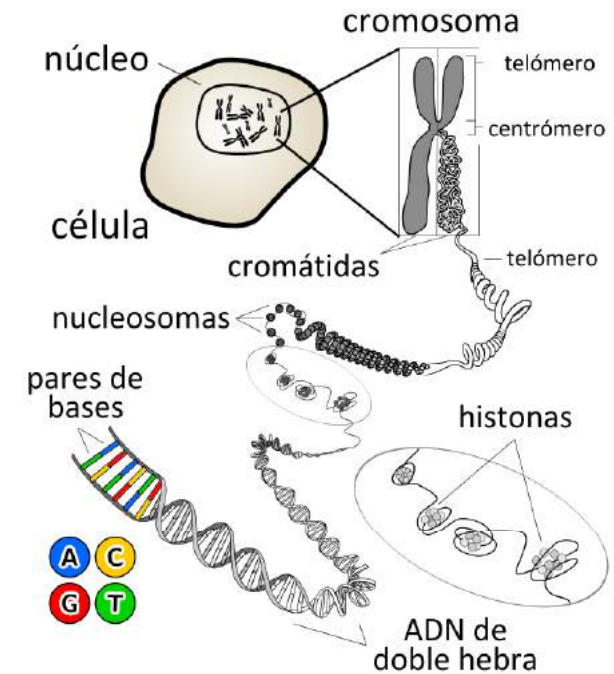
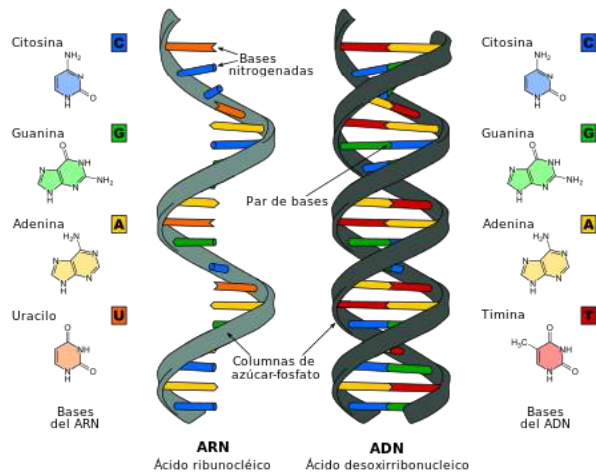
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. ELECTROFORESIS. APLICACIONES.

**BIOLOGIA MOLECULAR
Bioquímica
2022**

Dra. Silvana Petrocelli

1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ADN: fue aislado por **Johann Friedrich Miescher** en 1869 a partir de pus de desechos quirúrgicos y de espermatozoides de salmón. Dado que lo encontró solamente en los núcleos, denominó a este compuesto **nucleína**.



Fuentes de ADN y ARN:

- ❖ Bacterias, hongos, virus
- ❖ Células en cultivo (animales o vegetales)
- ❖ Tejidos animales, vegetales
- ❖ Medicina forense: cabellos, saliva, sangre

Extracción y Purificación de ácidos nucleicos

1. Separar el **ADN** o el **ARN** de otros componentes celulares como proteínas, lípidos, etc.
2. Evitar la fragmentación de las moléculas de ácidos nucleicos por ruptura mecánica o la acción de nucleasas endógenas o exógenas: **ADNasas** para el caso de ADN o **ARNasas** para el caso de ARN.

LA CALIDAD Y EL RENDIMIENTO SON IMPORTANTES!

- ✓ Los mejores rendimientos se obtienen de materiales frescos o congelados en nitrógeno líquido ($\sim -200\text{ }^{\circ}\text{C}$) o $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ✓ Para minimizar la acción de las nucleasas se debe trabajar rápidamente y en frío. Si las nucleasas actúan, se obtendrá un ADN o ARN de baja calidad (ADN/ARN degradado).
- ✓ Se debe evitar arrastrar solventes o sales durante la purificación que pueden afectar la actividad de enzimas de restricción, ADN polimerasas, etc.

Ruptura celular por métodos físicos o químicos

centrifugar

Sobrenadante: ADN, ARN y proteínas

Pellet: restos celulares

Eliminar proteínas

Extracción orgánica

Salting out

Unión selectiva del ADN o ARN a soportes sólidos (Sílica)

ARN

ADN

Sobrenadante
AN

fenol ácido fenol básico

Precipitación AN

Etanol

Isopropanol

**Lavado AN con
Etanol 70 %**

Resuspensión AN

ADN
tratamiento
con ARNasa

ARN
tratamiento
con ADNasa

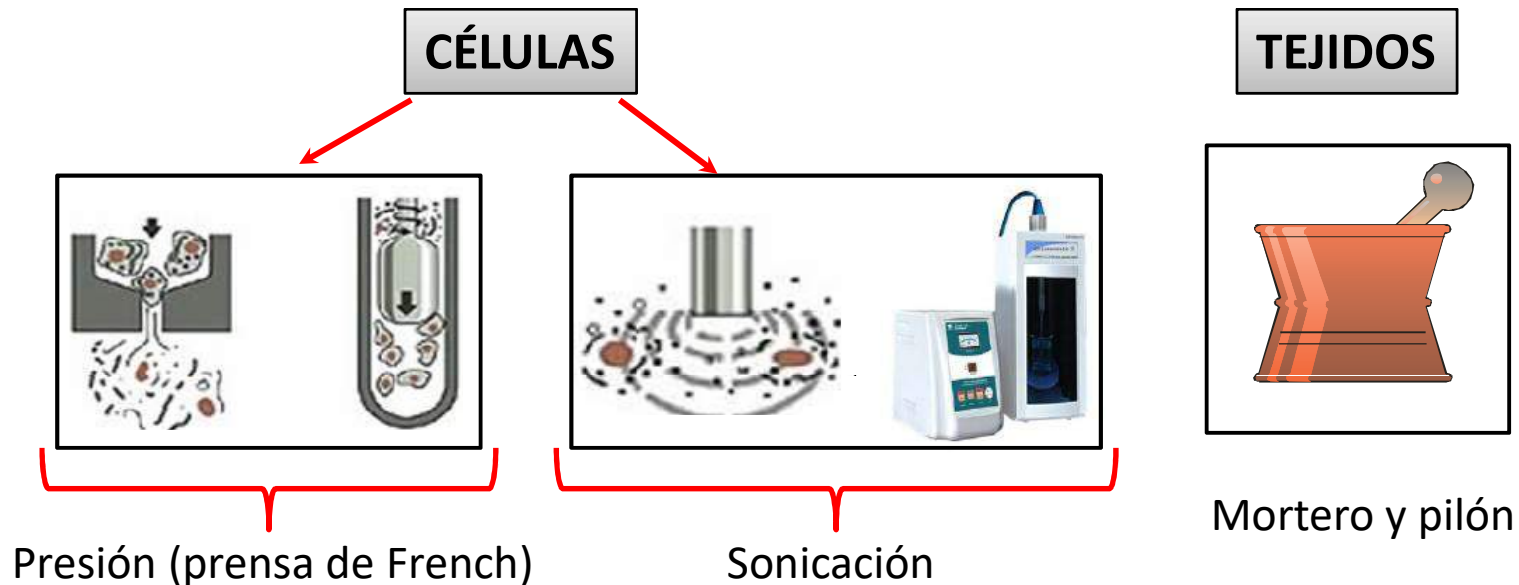
**Lavado AN en columna
con Etanol 70 %**

Elución AN de columna

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

LAS CÉLULAS SE DEBEN ROMPER PARA LIBERAR LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

MÉTODOS FÍSICOS: Fuerzas mecánicas rompen la membrana o pared celular.



MÉTODOS QUÍMICOS:

- ✓ Destrucción de la membrana celular utilizando detergentes (SDS, CTAB, etc).
- ✓ Destrucción pared celular:
 - Bacterias Gram+: tratamiento con lisozima, EDTA
 - Levaduras: tratamiento con liticasa o zimolasa
 - Plantas: tratamiento con celulasa

SEPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS DE LAS PROTEÍNAS

La desnaturalización de proteínas ocasiona:

- Disminución en la solubilidad de las proteínas
- Pérdida de actividad biológica
- Una digestión con proteasas más eficiente
- Liberación de ADN genómico de los complejos nucleoproteicos

AGENTES DESNATURALIZANTES

- Detergentes iónicos como el SDS se unen a los residuos de los aminoácidos causando cambios en la conformación de la proteína.
- Agentes caotrópicos como la urea y guanidino destruyen los enlaces puente de hidrógeno.
- Agentes reductores como el DTT o β -mercaptoetanol rompen los enlaces disulfuro.
- Algunos métodos de purificación de ADN utilizan proteasas como la proteinasa K para digerir proteínas.

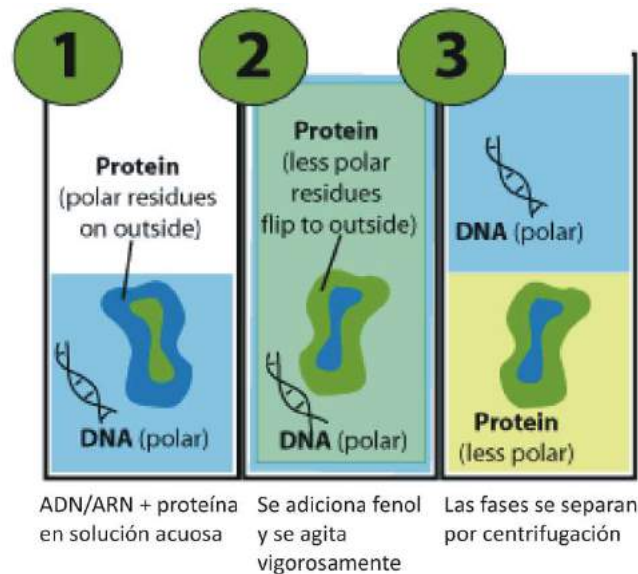
MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE LAS PROTEÍNAS

1. Extracción orgánica
2. Salting out
3. Unión selectiva del ADN o ARN a soportes sólidos

1. SEPARACIÓN POR EXTRACCIÓN ORGÁNICA

Ácidos nucleicos: son polares (grupos fosfatos con carga negativa) y por eso son insolubles en solventes orgánicos y solubles en solventes polares como el H_2O .

Proteínas: en solución acuosa los residuos no polares se encuentran en el interior de la proteína pero en un solvente menos polar pasan hacia el exterior (desnaturalización) y pasan a ser más solubles en la fase orgánica.



SOLVENTES ORGÁNICOS

FENOL

- Purificación de ARN: fenol saturado en buffer ácido.
- Purificación de ADN: fenol saturado en buffer levemente básico.
- Solubilidad en agua: 7%; facilita el proceso de desnaturalización y extracción de proteínas.

Es muy corrosivo y puede causar quemaduras severas (usar guantes).

CLOROFORMO

- Menor capacidad para desnaturalizar proteínas.
- Solubilidad en agua: 0,8 %; ayuda a eliminar el fenol remanente en la fase acuosa.
- Favorece la separación de la fase acuosa y la orgánica y reduce la interfase entre las mismas.

2. SEPARACIÓN POR SALTING OUT

- ✓ A concentraciones salinas altas, las sales se asocian con los grupos cargados de las proteínas, éstas se deshidratan, pierden solubilidad y precipitan. Se utiliza NaCl, KAc o NH_4Ac .
- ✓ Las proteínas precipitadas son eliminadas por centrifugación.
- ✓ Los AN quedan en el sobrenadante.

3. UNIÓN SELECTIVA DEL ADN/ARN A SOPORTES SÓLIDOS

Soportes sólidos

- Silica
- Matriz con oligo dT unido (ARNm)

SILICA

- Los AN se unen a la silica en presencia de concentraciones altas de sales caotrópicas (ej. cloruro de guanidinio).
- Purificar ADN: tratamiento con ARNasa.
- Purificar ARN: tratamiento con ADNasa.
- Las proteínas no se unen bajo estas condiciones.
- Las membranas de silica con el ADN/ARN unido se lavan para eliminar las sales.
- El ADN/ARN se eluye de la membrana utilizando buffers de baja fuerza iónica (TE) o agua.

Columna de silica
para purificación de
ADN



SILICA

Ventajas:

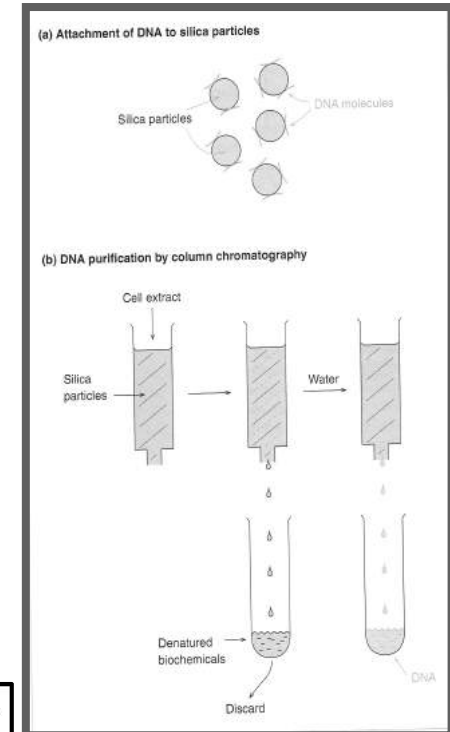
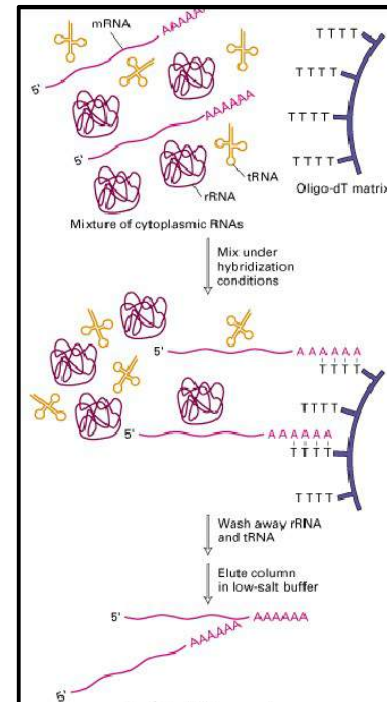
- Es más rápido .
- No se utilizan solventes orgánicos.
- Permite la automatización y trabajar con un gran número de muestras a la vez.
- No hay pasos de precipitación.

Desventaja:

Costos más elevados

MATRIZ DE OLIGO(dT)

- Oligonucleótidos que se unen a las colas de polyA de los ARNm de eucariotas.
- Los otros ARNs se eliminan lavando la matriz.
- El ARNm puro se eluye de la columna con H₂O o buffer de baja fuerza iónica. De esta manera se logra purificar el ARNm de otros ARNs.



PRECIPITACIÓN CON ALCOHOL DEL ADN/ARN

- ✓ Luego de eliminar las proteínas por el método de extracción orgánica o salting out, el ADN/ARN queda en la fase acuosa.
- ✓ El ADN/ARN precipita en presencia de **etanol o isopropanol** y cationes que neutralizan las cargas negativas de los grupos fosfatos.
- ✓ La precipitación del ADN/ARN es más eficiente a bajas temperaturas y altas concentraciones de AN.

En soluciones acuosas se forma una capa hidratante alrededor de la molécula de AN. En presencia de **etanol**, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfatos. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el AN precipite.

ETANOL vs ISOPROPANOL

Los AN son menos solubles en isopropanol que en etanol y por eso van a precipitar más rápido y a menores concentraciones, pero las sales también van a precipitar mejor en este solvente.

ETANOL

- El ADN/ARN en solución se precipita agregando 2-2,5 volúmenes de etanol, 4 °C.
- Se utiliza cuando es necesario incubar a bajas temperaturas y por tiempo prolongado, por ej para precipitar moléculas pequeñas o que están en baja concentración.

ISOPROPANOL

- El ADN/ARN en solución se precipita agregando 1 volumen de isopropanol a temperatura ambiente (menor volumen para centrifugar).
- La precipitación a temperatura ambiente y por tiempos cortos favorece la precipitación de moléculas grandes.
- El isopropanol es menos volátil que el etanol y es más difícil de eliminar. Las sales como el NaCl coprecipitan más fácilmente.

En ambos casos, las sales se eliminan lavando el pellet de ADN/ARN con Etanol 70%. El 30% de agua solubiliza las sales contaminantes mientras que el 70% de etanol mantiene los AN precipitados.

RESUSPENSIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL ADN

- Buffer **TE**: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA.
- Es recomendable almacenar el ADN en un buffer ligeramente básico para evitar la depurinización y acción de ADNasas. El EDTA quelata a los iones Mg^{2+} ayudando a mantener a las ADNasas inactivas.
- Se puede resuspender en H_2O .
- El ADN se puede conservar a 4°C. Por períodos prolongados es preferible hacerlo a -20°C o -80°C .
- Evitar el congelado y descongelado del ADN, ya que puede ocasionar degradación.

RESUSPENSIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL ARN

- La solución de resuspensión debe cumplir tres cualidades:

1) libre de ARNasa, 2) pH ligeramente ácido (6-7), 3) agente quelante. Estos dos últimos puntos son necesarios para evitar la hidrólisis de ARN que ocurre a pH básicos y catalizado por iones divalentes. Ejs: citrato de sodio, pH 6,4; H₂O libre de ARNasas.

- Almacenar por períodos cortos a -20°C y por períodos prolongados a -80°C. El ARN es más estable si se almacena -80°C precipitado con NH₄Ac/etanol.

- Evitar el congelado y descongelado del ARN ya que puede ocasionar degradación.

Ribonucleasas (ARNasas): degradan el ARN

- Es un contaminante común en el laboratorio (bacterias, humanos, ARNasa utilizada en preparación de ADN plasmídico), se libera del interior celular durante la extracción de ARN de las muestras biológicas.

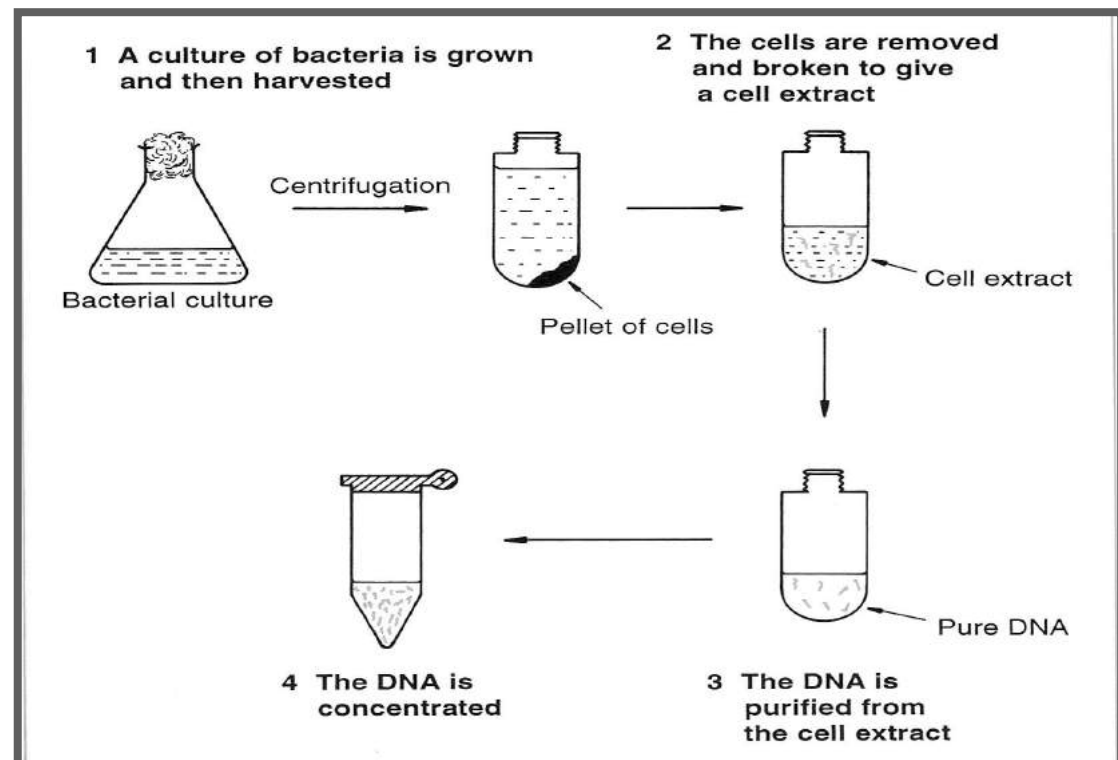
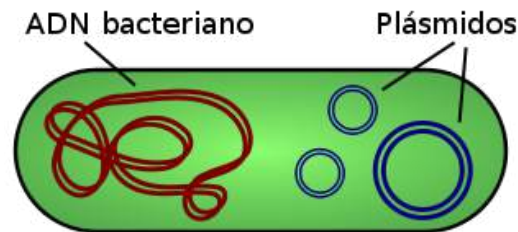
- Difícil de inactivar.

¿Cómo protegerse de las ARNasas?

- Usar guantes.
- Utilizar material libre de ARNasas (autoclavar; limpiar material con inhibidor de ARNasas).
- Utilizar reactivos que se utilicen sólo para extracción de ARN.
- Utilizar H₂O tratada con **DEPC (dietilpirocarbonato)**: inactiva eficientemente a las ARNasas pero es carcinogénico.

PURIFICACIÓN DE ADN DE BACTERIAS

1. Se crecen las bacterias y se cosechan por centrifugación.
2. Las células se rompen y se libera su contenido.
3. Los extractos celulares se tratan para eliminar todos los componentes excepto el ADN .
4. Se concentra la solución de ADN.



PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

MINIPREP: 1-2 mL

MIDIPREP: 10 mL

MAXIPREP: 500 mL

MÉTODO DE LISIS ALCALINA

(Birnboim and Doly (1979), Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523)

La exposición de suspensiones bacterianas a detergentes fuertemente aniónicos (SDS) a alto pH (NaOH) provoca la ruptura de la pared celular, desnaturaliza el ADN cromosómico y las proteínas y libera el ADN plasmídico al sobrenadante.

¿Cómo separar el ADN plasmídico del ADN genómico?

Esto se logra en base a las diferencias entre ambos

1- Tamaño: los plásmidos son más pequeños.

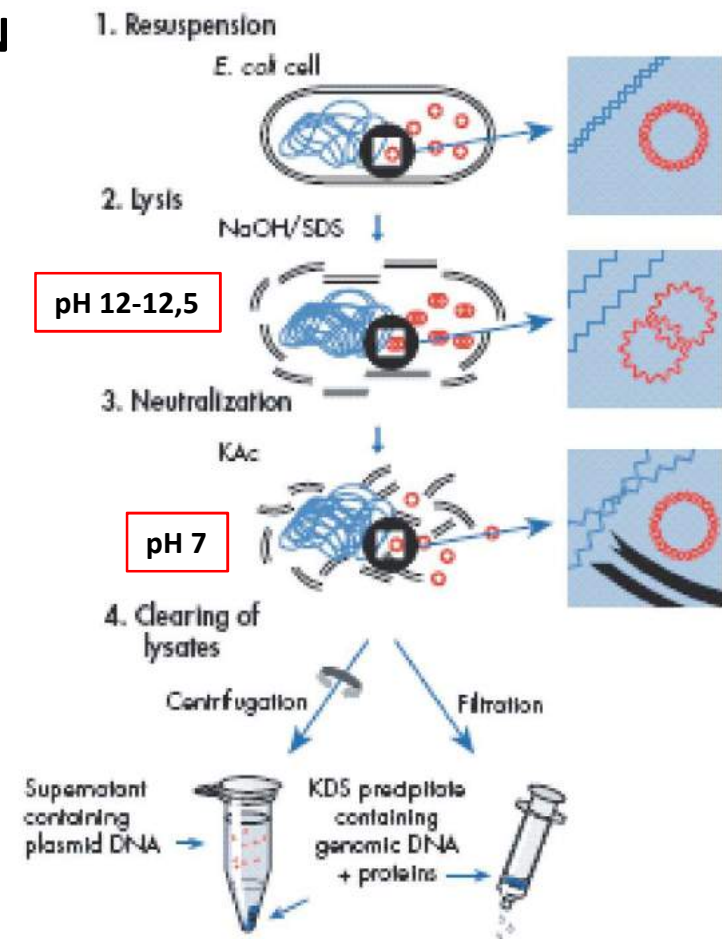
2- Conformación: plásmidos circulares superenrollados.

1-Separación en base al tamaño

Para maximizar la diferencia se debe minimizar la ruptura mecánica del ADN. Esto se logra usando técnicas suaves de disrupción celular. De esta forma el ADN genómico queda en el pellet junto con los restos celulares.

2-Separación basada en la conformación del ADN

- Se resuspenden las células enteras en Tris-EDTA-glucosa (Lisógeno I).
- Se agrega NaOH/SDS: el ADN se desnaturaliza (Lisógeno II).
- Se neutraliza la solución (KAc): el ADN plasmídico se renaturaliza (Lisógeno III).
- Las hebras de ADN genómico quedan separadas, unidas a proteínas y luego de la centrifugación queda en el pellet y el ADN plasmídico en el sobrenadante.



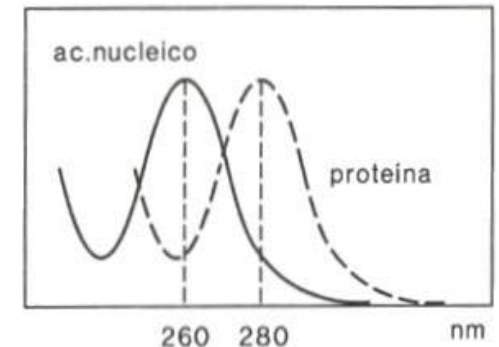
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE ADN Y ARN POR ESPECTROFOTOMETRÍA

230 nm: absorben las sales de guanidinio y el fenol.

260 nm: absorben los nucleótidos.

280 nm: absorben los residuos de tirosina y triptofano de las proteínas.

320 nm: es una medida de la turbidez de la muestra y se resta de los valores de A_{260} . Valores altos indican contaminaciones inespecíficas.



-ADN doble hebra: $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$

-ADN simple hebra: $1 A_{260} = 33 \mu\text{g/ml}$

-ARN simple hebra: $1 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$

-Oligonucleótidos: $1 A_{260} = 20\text{-}30 \mu\text{g/ml}$

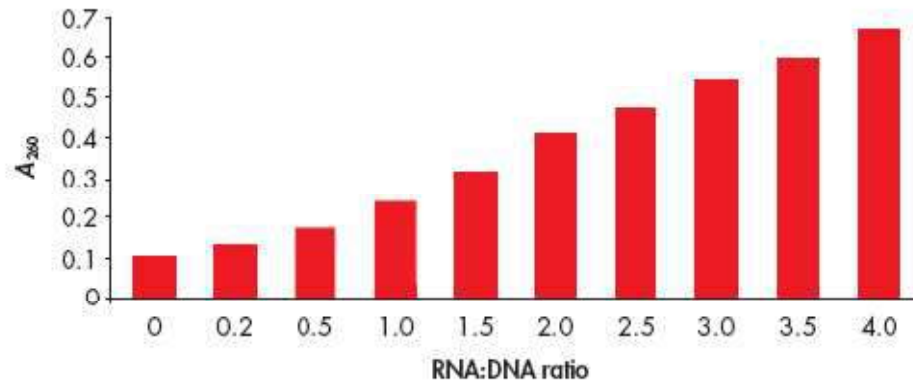
- A_{260} : 0,1-1,0

- A_{260}/A_{280} 1,8-2,0

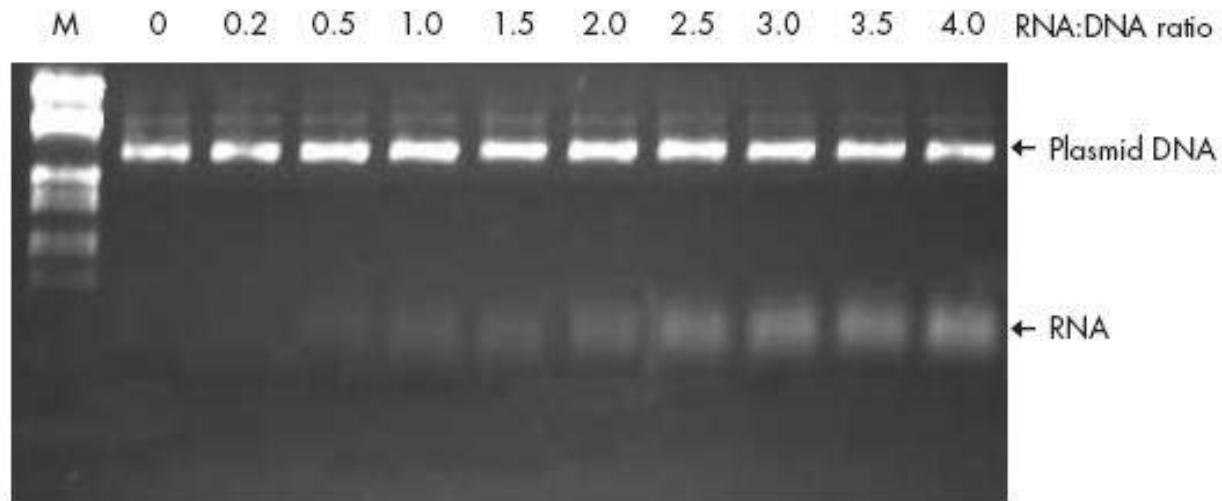
- A_{260}/A_{230} 1,8-2,0

Las medidas espectrofotométricas dan una idea de la pureza de los ácidos nucleicos pero no de su integridad.

ADN contaminado con ARN



La cuantificación espectrofotométrica del ADN es correcta sólo cuando no está contaminado por ARN y viceversa

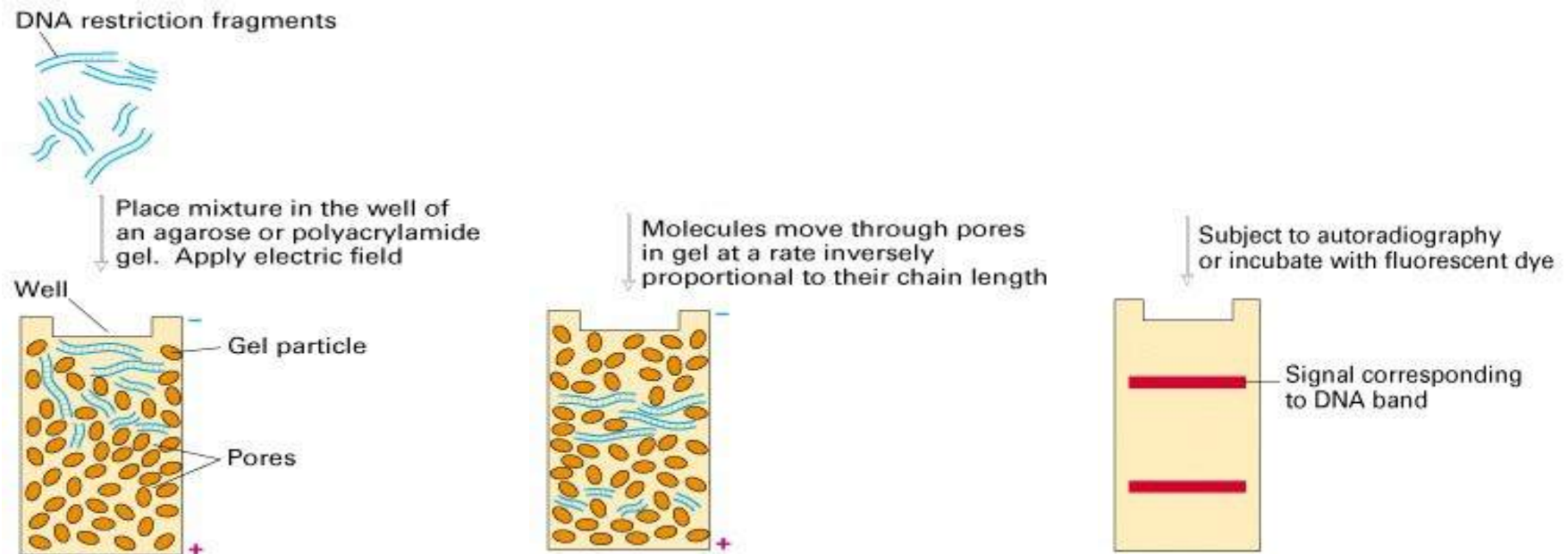


2. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Técnica que permite la separación de moléculas de ADN o ARN en base a su tamaño o conformación, al ser sometidas a un campo eléctrico.

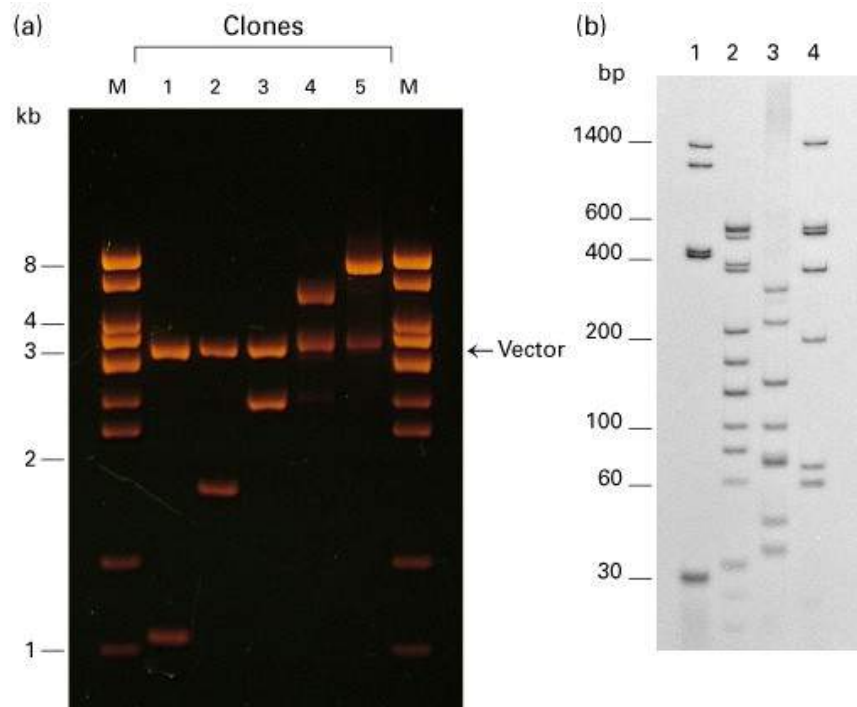
Moléculas de ADN → Carga constante por unidad de masa → Separación en base a tamaño y conformación

Geles de agarosa o poliacrilamida: actúan como tamices moleculares



- Visualización del ADN mediante tinción con colorantes intercalantes fluorescentes. Pueden detectarse bandas que contienen cantidades de ADN tan pequeñas como 1–10 ng.
- Las bandas de ADN pueden recuperarse del gel y usarse con distintos propósitos (clonado, restricción, secuenciación, etc.), por lo que puede utilizarse como una **técnica preparativa**.

USOS: análisis de integridad de ácidos nucleicos, mapas de restricción, estimación de tamaños moleculares, purificación de muestras.

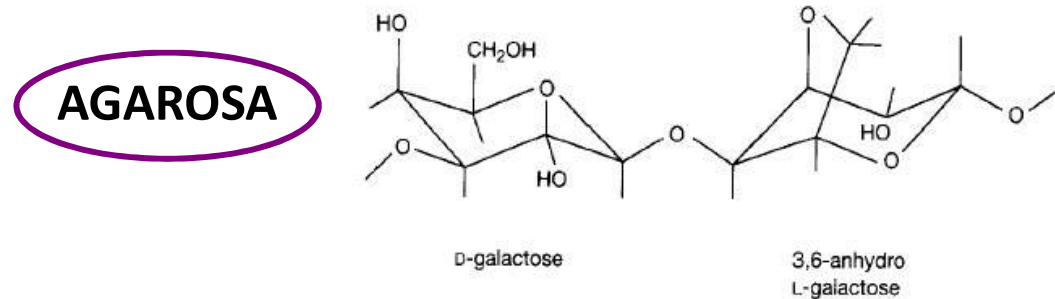


Visualización de fragmentos de restricción separados por electroforesis en geles

FIGURE 7-24 Separation of restriction fragments by gel electrophoresis. (a) Several different plasmid clones were digested with *Eco*RI and the digested DNA was subjected to agarose gel electrophoresis to separate the clone fragments from the plasmid vector DNA. Each *Eco*RI-cut plasmid was layered on a separate well. As a "marker" for estimating the sizes of the cloned fragments, adenovirus 2 (Ad2) was digested with *Hind*III and layered in the left and right wells of the gel. The lengths of the Ad2 *Hind*III fragments were calculated from the Ad2 DNA sequence. (b) Autoradiogram of 32 p-labeled fragments separated by polyacrylamide gel electrophoresis. Lengths of fragments in the left lane are indicated in base pairs.

Tipos de geles utilizados para la electroforesis de ácidos nucleicos

→ Agarosa
→ Poliacrilamida

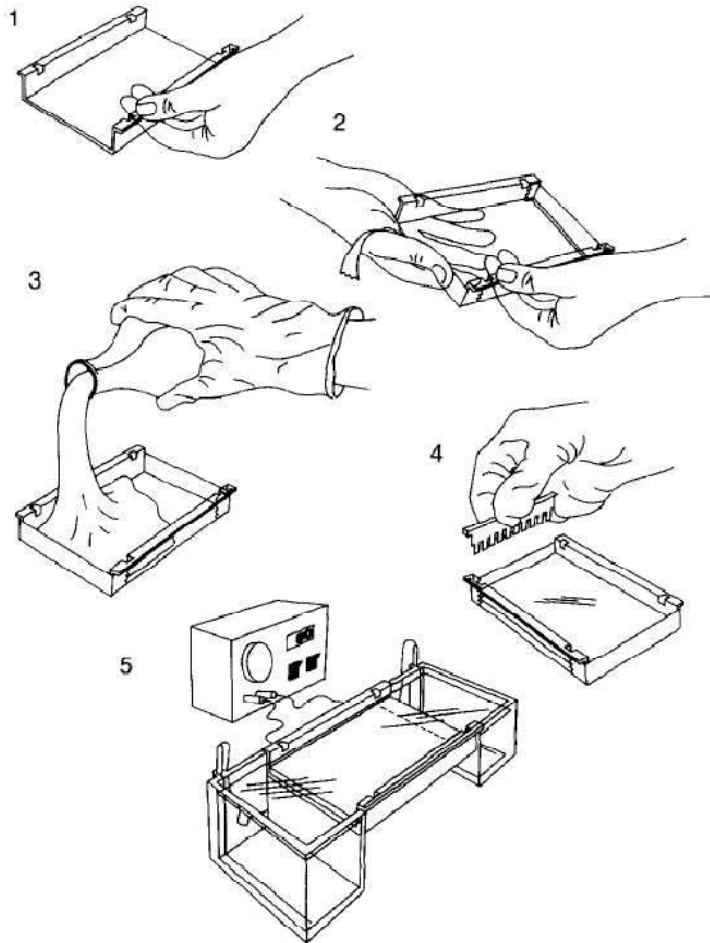


- Polímero lineal formado por residuos de D- y L-galactosa alternados
- Las cadenas de agarosa forman fibras helicoidales que se agregan en estructuras superenrolladas con radios de 20 a 30 nm
- La gelificación de la agarosa produce una malla tridimensional con canales de 50 a más de 200 nm de diámetro

Clases de agarosa:

- *Standard (de alta temperatura de fusión)*, para analizar y aislar fragmentos de 1 a 25 kb
- *De baja temperatura de fusión/gelificación* (se funden a bajas temperaturas ~65 °C), para recuperación rápida de fragmentos de ADN que puede ser manipulado enzimáticamente con mayor eficiencia

Preparación de geles de agarosa



- Fundir la agarosa en presencia de un buffer adecuado
- Colocar la solución en un molde apropiado provisto de un peine para formar las celdas donde se sembrará la muestra
- La agarosa gelifica formando una matriz cuya densidad depende de la concentración del polímero
- Al aplicarse un campo eléctrico el ADN, cargado negativamente, migrará a través del gel hacia el ánodo

FACTORES QUE DETERMINAN LA VELOCIDAD DE MIGRACIÓN DEL ADN EN GELES DE AGAROSA

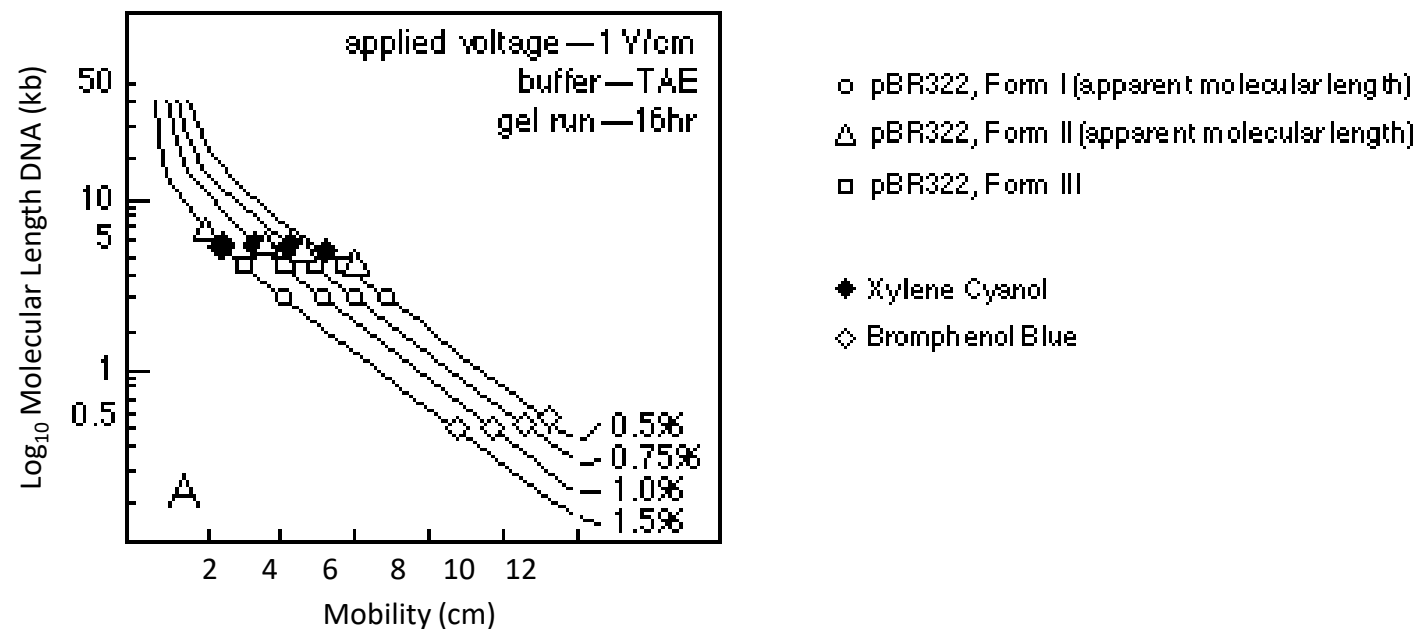
Tamaño molecular del ADN

Cuanto más grande es la molécula de ADN, menor su movilidad electroforética.

Moléculas de ADN lineal doble hebra: $V_{\text{migración}} \approx 1/\log_{10} \text{pb}$

- *Límite de resolución*, se alcanza cuando el radio de giro de la molécula es mayor al tamaño del poro del gel (determinado por el tamaño de poro del gel de agarosa).

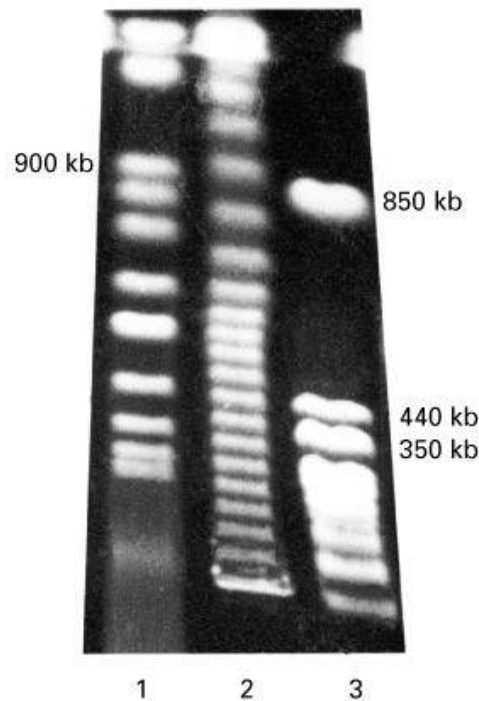
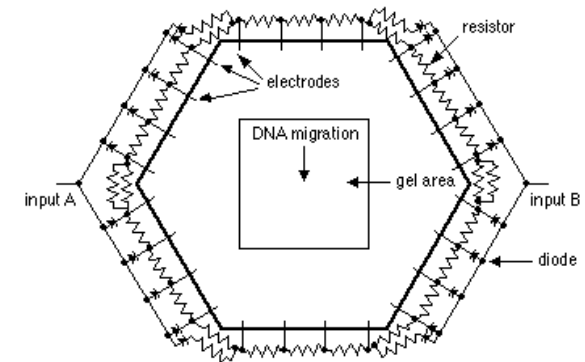
- Marcadores de PM.



Electroforesis de campo pulsátil (PFGE) (Schwartz y Cantor, 1984)

Alteraciones periódicas en la dirección de migración del ADN mediante cambios regulares en la orientación del campo eléctrico. (aplicación de campos eléctricos ortogonales, alternos y en pulsos).

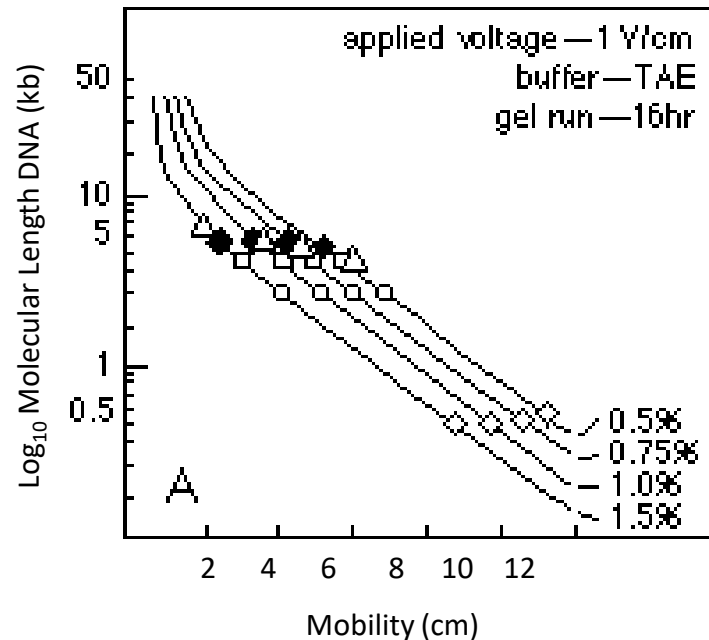
En cada pulso las moléculas de ADN deben reorientarse a lo largo del nuevo eje del campo eléctrico. Aquellas moléculas de ADN cuyos tiempos de reorientación son menores que el período del pulso eléctrico son fraccionadas de acuerdo a su tamaño.



- Permite resolver moléculas de ADN mayores a 6000 kb.
- Puede ser utilizada para determinar el tamaño de genomas bacterianos y el nº y tamaño de los cromosomas de eucariotas simples (ej. *S. cerevisiae*).
- Es utilizada para estudiar la organización del genoma y para clonar y analizar fragmentos de ADN de gran tamaño.

Concentración de agarosa

Determina el tamaño del poro de la matriz y por lo tanto el tamaño de las moléculas de ADN que se van a separar adecuadamente.



$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau$$

μ : movilidad electroforética del ADN

τ : concentración de agarosa del gel

μ_0 : movilidad electroforética del ADN libre

K_r : coeficiente de retardo
(propiedades del gel y tamaño y forma de las moléculas que migran)

Rango de resolución de moléculas de DNA en geles con diferentes concentraciones de agarosa

Agarosa (%)	Rango efectivo de resolución de fragmentos de DNA lineal (kb)
0,5	30 - 1
0,7	12 - 0,8
1,0	10 - 0,5
1,2	7 - 0,4
1,5	3 - 0,2

Cuanto menor es la concentración de agarosa, mayor es el tamaño del poro del gel y mayor el tamaño de las moléculas de ADN que se van a resolver adecuadamente.

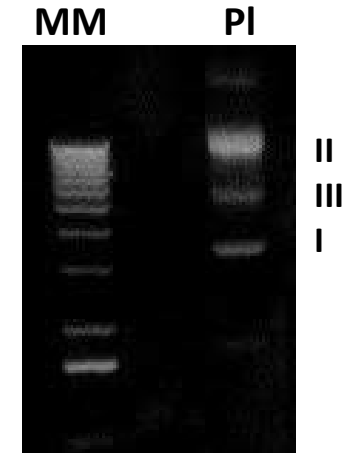
Conformación del ADN

Moléculas de ADN del mismo tamaño pueden migrar a diferentes velocidades dependiendo de su conformación espacial.

- ADN circular superenrollado (forma I)
- ADN circular nickeado o relajado (forma II)
- ADN lineal (forma III)



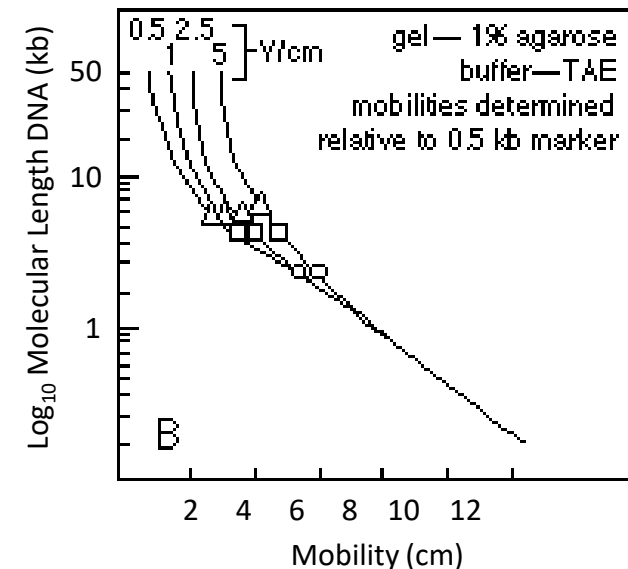
Las movilidades relativas de las tres formas dependerán de la concentración y tipo de agarosa, de la fuerza de la corriente aplicada, de la fuerza iónica del buffer y de la densidad de giros superhelicoidales en el ADN circular superenrollado.



Voltaje aplicado

A voltajes bajos, la velocidad de migración de fragmentos lineales de DNA es proporcional al voltaje aplicado.

El rango efectivo de separación en geles de agarosa disminuye a medida que el voltaje aumenta.



Buffer de electroforesis

Fuerza iónica muy baja → Conductividad mínima, migración muy lenta

Fuerza iónica muy alta → Conductividad eléctrica muy eficiente, generación de calor

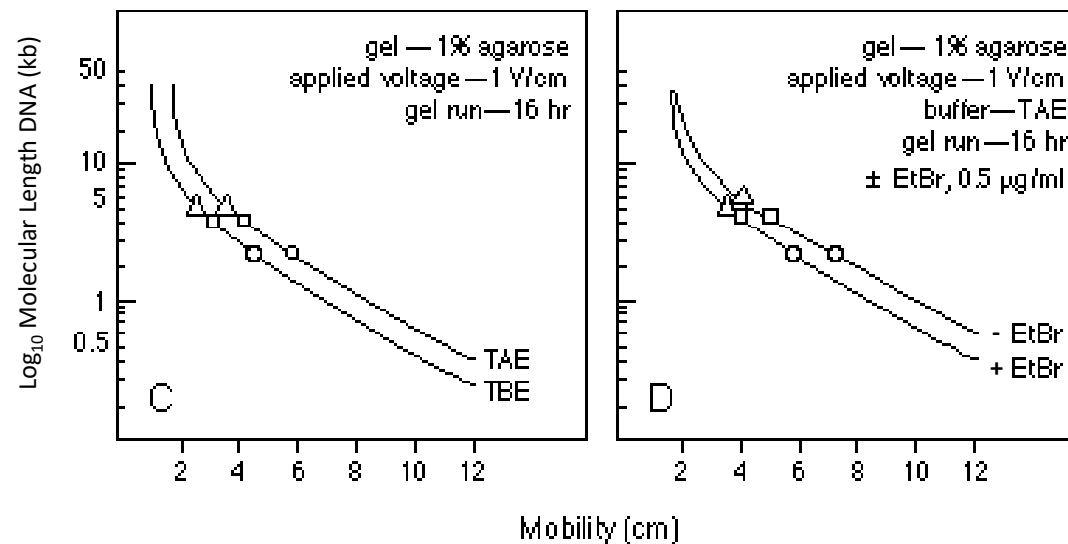
Buffers: TAE, TBE, TPE (velocidad de migración levemente superior en TAE)

TABLE 5-3 Electrophoresis Buffers

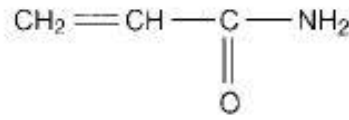
BUFFER	WORKING SOLUTION	STOCK SOLUTION/LITER
TAE	1x 40 mM Tris-acetate 1 mM EDTA	50x 242 g of Tris base 57.1 ml of glacial acetic acid 100 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
TPE	1x 90 mM Tris-phosphate 2 mM EDTA	10x 108 g of Tris base 15.5 ml of phosphoric acid (85%, 1.679 g/ml) 40 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
TBE ^a	0.5x 45 mM Tris-borate 1 mM EDTA	5x 54 g of Tris base 27.5 g of boric acid 20 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Presencia de colorantes intercalantes

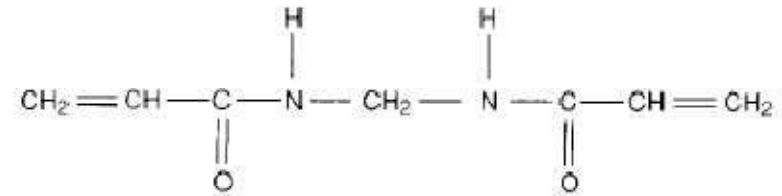
Disminución en la carga negativa del ADN y aumento de la longitud y la rigidez de la molécula → disminución de la movilidad electroforética.



POLIACRILAMIDA



acrylamide



N,N'-methylenebisacrylamide

Ventajas de los geles de poliacrilamida:

- alto poder de resolución
(separación de moléculas de ADN con diferencias de longitud de 0.1%).
- alojan cantidades mucho más grandes de ADN que los geles de agarosa.
(hasta 10 µg de ADN en pocillo de 1cm x 1mm)
- El ADN recuperado es extremadamente puro.

Polimerización de la acrilamida:

- Persulfato de amonio (APS) → catalizador
- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) → iniciador

Tamaño de poro del gel:

Determinado por la longitud de las cadenas y el grado de entrecruzamiento

%T: % p/v de acrilamida más bis-acrilamida.

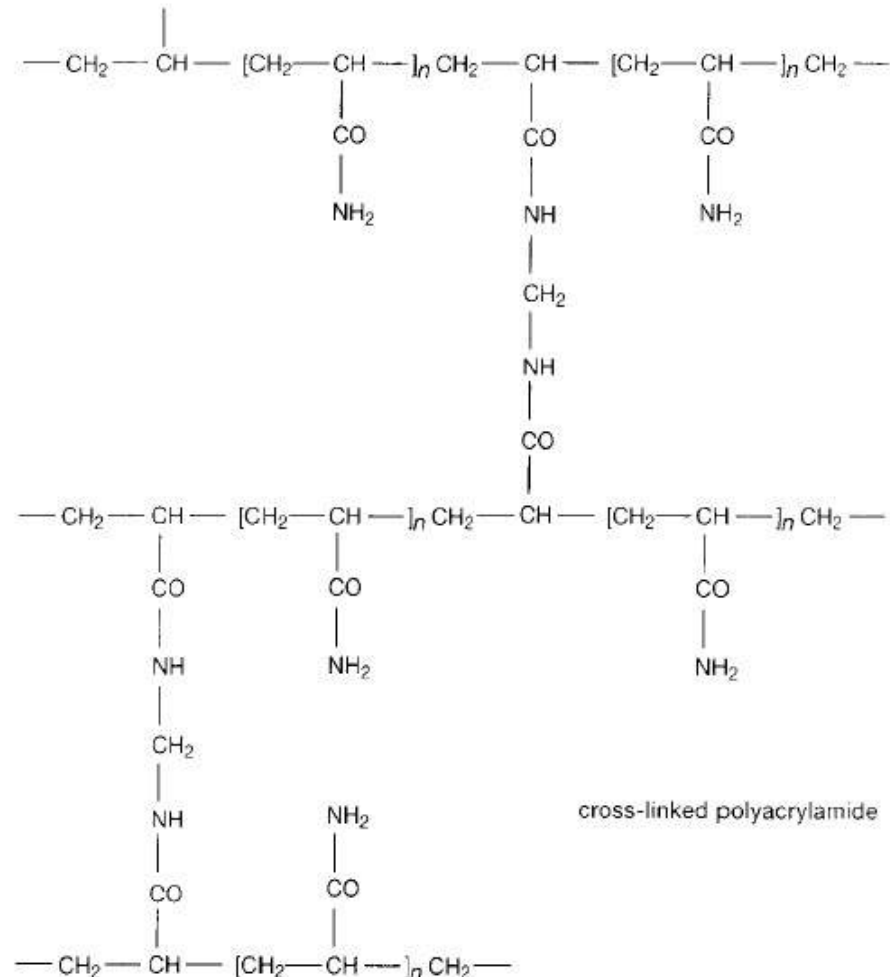


TABLE 5-6 Effective Range of Separation of DNAs in Polyacrylamide Gels

CONCENTRATION OF ACRYLAMIDE MONOMER (%) ^a	EFFECTIVE RANGE OF SEPARATION (bp)	XYLENE CYANOL FF ^b	BROMOPHENOL BLUE ^b
3.5	1000–2000	460	100
5.0	80–500	260	65
8.0	60–400	160	45
12.0	40–200	70	20
15.0	25–150	60	15
20.0	6–100	45	12

^aN,N'-methylenebisacrylamide is included at 1/30th the concentration of acrylamide.

^bThe numbers given are the approximate sizes (in nucleotide pairs) of fragments of double-stranded DNA with which the dye comigrates.

Tipos de geles de poliacrilamida

No desnaturalizantes:

- separación y purificación de fragmentos de ADN doble hebra.
- $V_{\text{migración}} \approx 1/\log_{10} \text{ pb}$, movilidad electroforética también afectada por composición de bases y secuencia.
- Uso: preparación de fragmentos de ADN de alta pureza; separación de fragmentos de pequeño tamaño.

Desnaturalizantes:

- separación y purificación de fragmentos de ADN simple hebra.
- son polimerizados en presencia de urea o formamida.
- velocidad de migración casi completamente independiente de la composición de bases y secuencia.
- Uso: análisis de los productos de reacciones de secuenciación.

Los geles de poliacrilamida se corren en buffer TBE 0.5X o 1X a bajo voltaje (1-8 V/cm)

BUFFER DE SIEMBRA

- confieren densidad a la muestra (glicerol o sacarosa)
- contienen colorantes que permiten monitorear el progreso de la corrida electroforética

Azul de Bromofenol: migra como molécula de ADN lineal de ~ 500 pb

Xilen Cyanol: migra como molécula de ADN lineal de ~ 5 kb

Visualización de los ácidos nucleicos

Tinción con colorantes intercalantes fluorescentes: bromuro de etidio, Sybr safe, etc.

Bromuro de etidio: la irradiación con luz UV conduce a la emisión de fluorescencia a 590 nm

↳ Detección de ácidos nucleicos de simple y doble hebra (ARN y ARN)

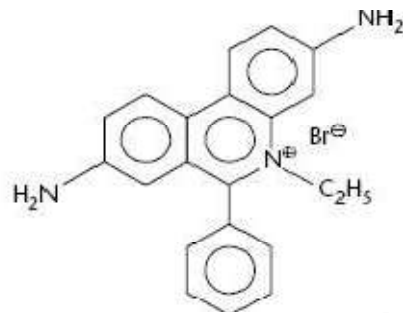
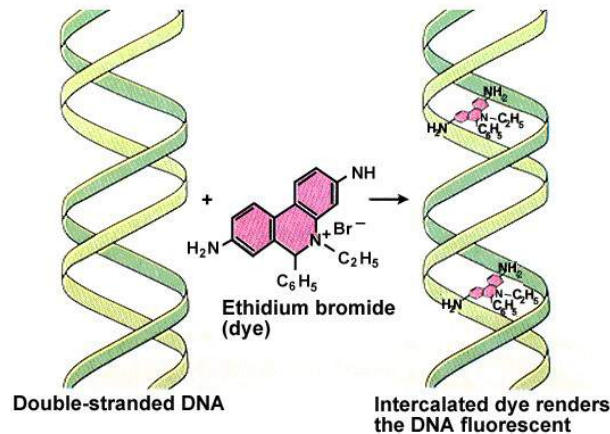


Fig. 2.3 Ethidium bromide.



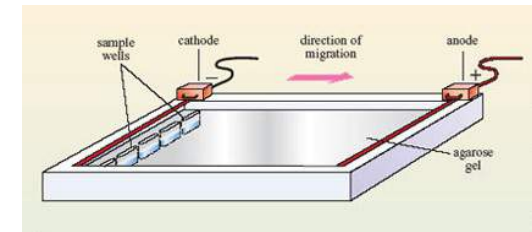
! El bromuro de etidio inhibe la polimerización de la acrilamida, estos geles deben ser teñidos luego de la corrida electroforética.

Nueva generación agentes intercalantes que no atraviesan membrana celular: Gel Green y Gel Red.

Comparación geles de agarosa y poliacrilamida

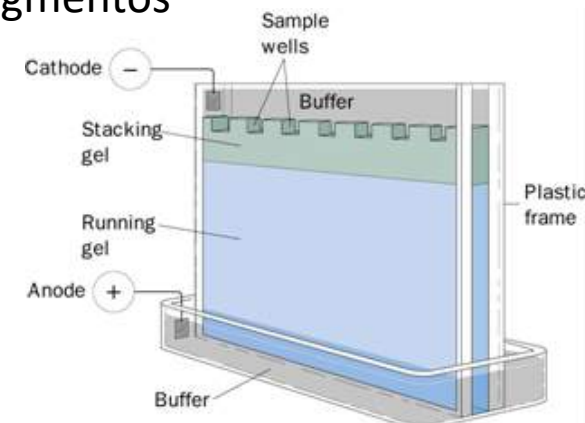
Geles de agarosa

- constituyen mejores tamices para moléculas grandes (mayores de unos 500 pb)
- tienen menor poder de resolución pero un mayor rango de separación; fragmentos de ADN desde 50 pb a varios mega pb de longitud pueden ser separados utilizando geles de diferentes concentraciones de agarosa.
- generalmente se corren en posición horizontal.
- se puede agregar el colorante fluorescente en el gel o hacer una tinción luego de la corrida



Geles de poliacrilamida

- son mejores para separar moléculas de ADN más pequeñas (5-500 pb).
- su poder de resolución es muy grande, pueden separarse fragmentos de ADN que difieren en 1 pb (ej. geles de secuenciación).
- son más difíciles de preparar y manipular.
- la tinción se realiza luego de la corrida electroforética (bromuro de etidio inhibe polimerización).
- se corren en posición vertical.

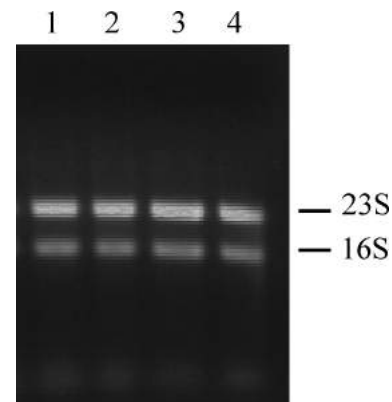


Electroforesis de ARN

Los procedimientos utilizados son en principio los mismos que para ADN pero con algunas diferencias técnicas:

- agregado de un agente desnaturizante para eliminar estructuras secundarias del ARN (formaldehído, glioxal/DMSO).
- deben extremarse precauciones para evitar la degradación del ARN por ribonucleasas:
 - utilizar materiales convenientemente tratados (calentamiento a más de 200°C por más de 4 horas o con productos especiales para plásticos o acrílicos).
 - todas las soluciones deben prepararse con agua tratada con DEPC.

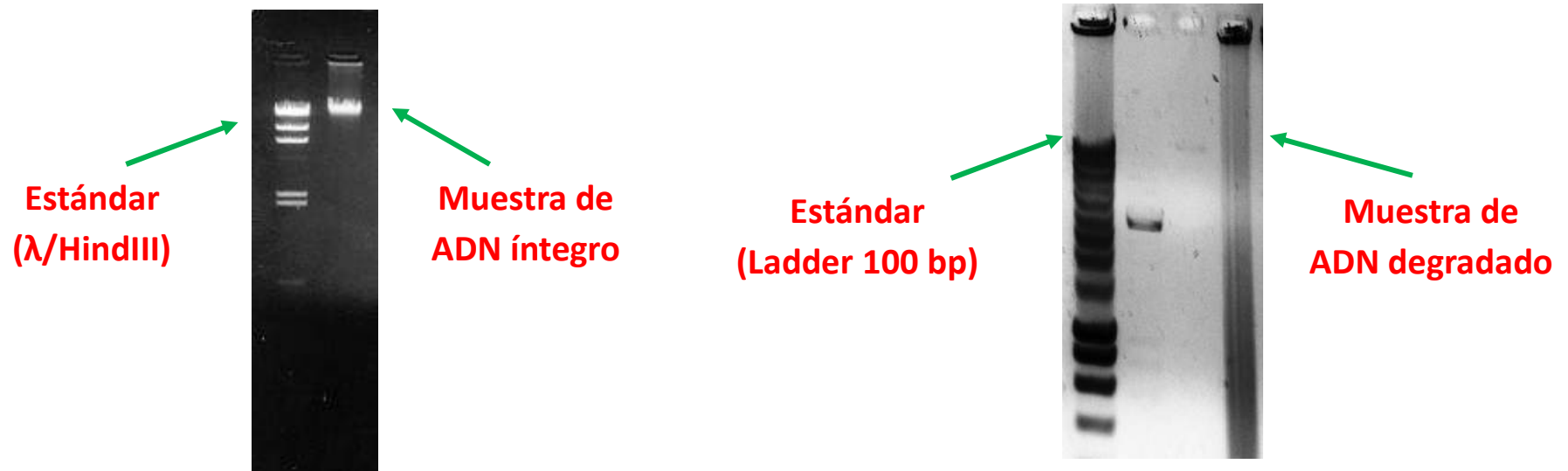
Visualización de ARN bacteriano en gel de agarosa:



3. APLICACIONES DE ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

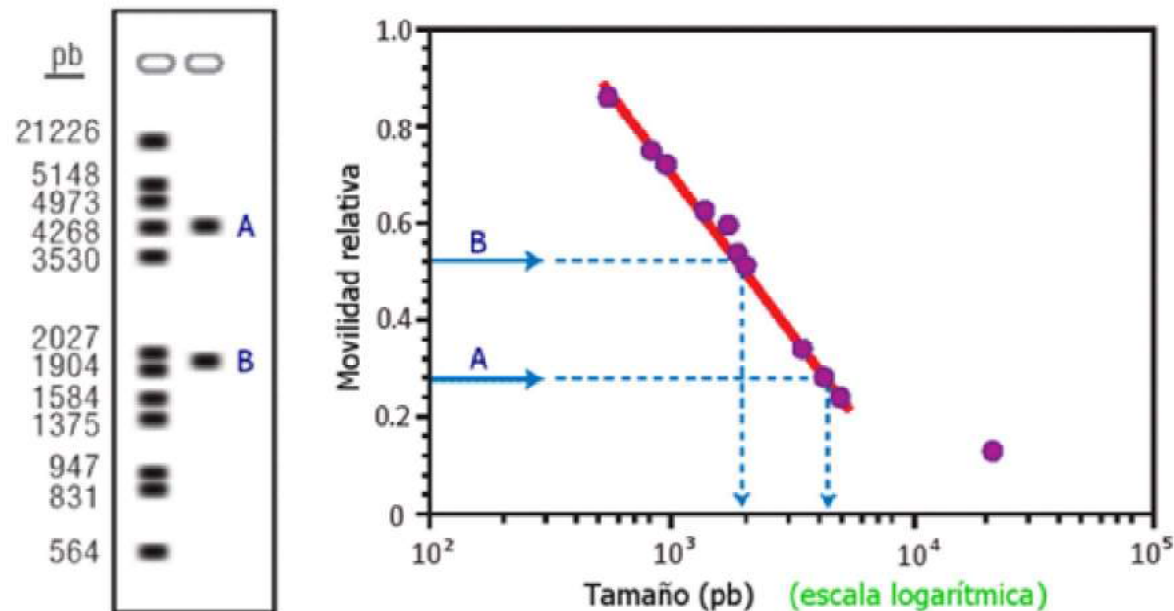
✓ DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL ADN

Permite determinar la integridad del ADN o ARN y, para el caso del ADN, estimar la concentración en base a la comparación de la intensidad de la banda entre una muestra y un estándar de concentración conocida.



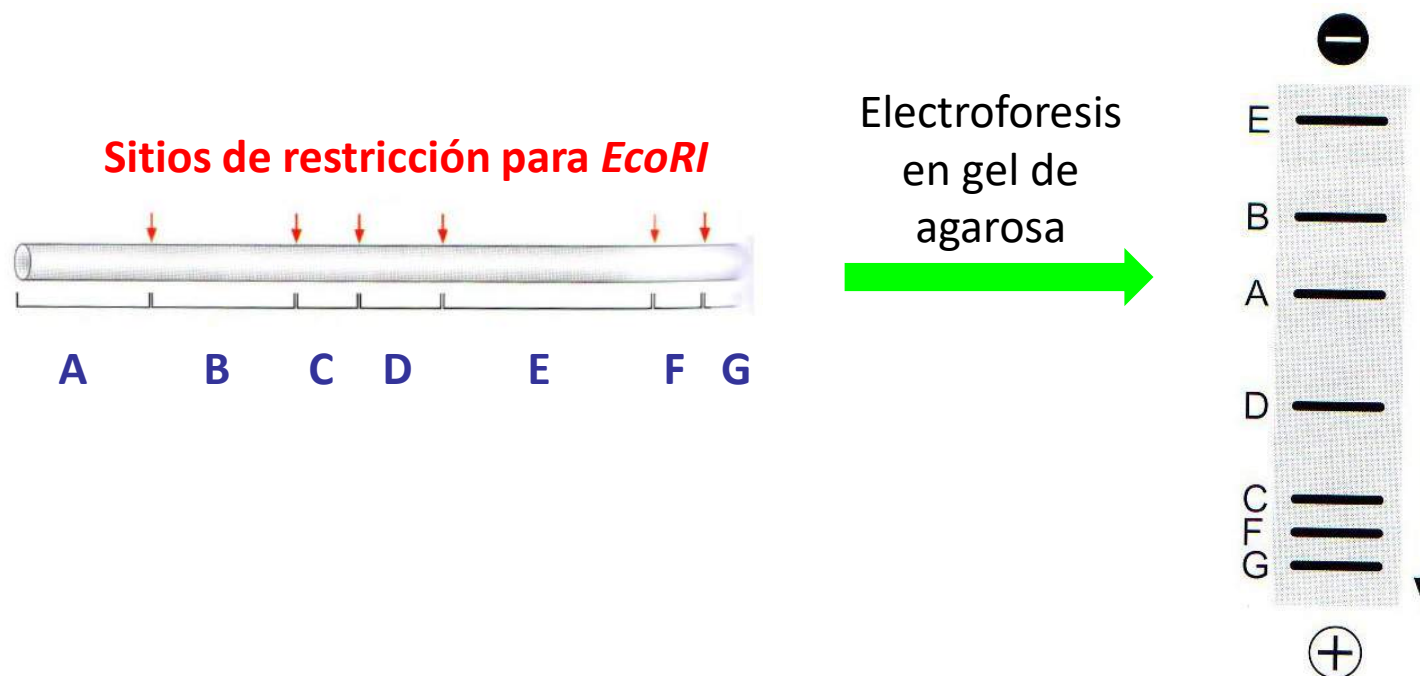
✓ ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE FRAGMENTOS DE ADN

Permite estimar el tamaño en pb de un fragmento de ADN comprando la movilidad electroforética del mismo con un patrón conteniendo fragmentos de ADN de tamaño conocido (“**marcador de tamaño molecular**”).



✓ PATRONES DE RESTRICCIÓN. MAPAS DE RESTRICCIÓN.

Patrón de Restricción: patrón de bandas, analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa, generado por la digestión de un fragmento de ADN con una o más enzima de restricción.

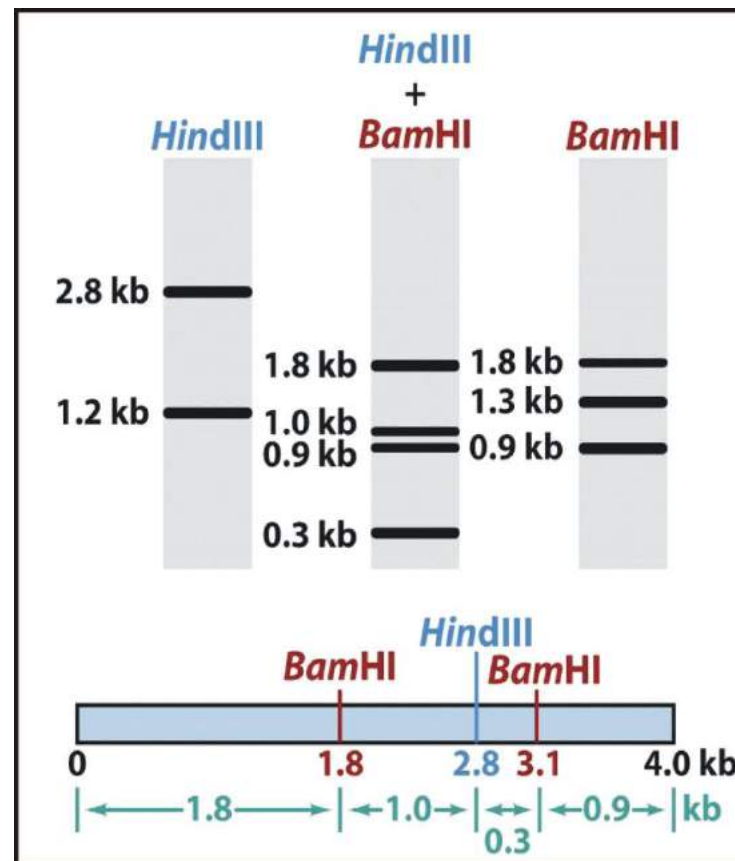


El **Patrón de Restricción** de un individuo constituye un mapa físico del material genético de ese individuo y su uso está enfocado a la comparación entre individuos.

MAPAS DE RESTRICCIÓN

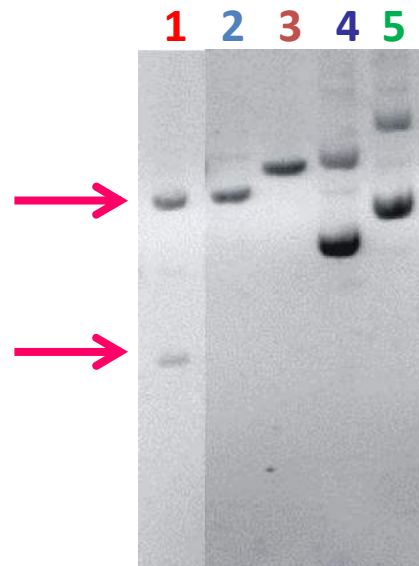
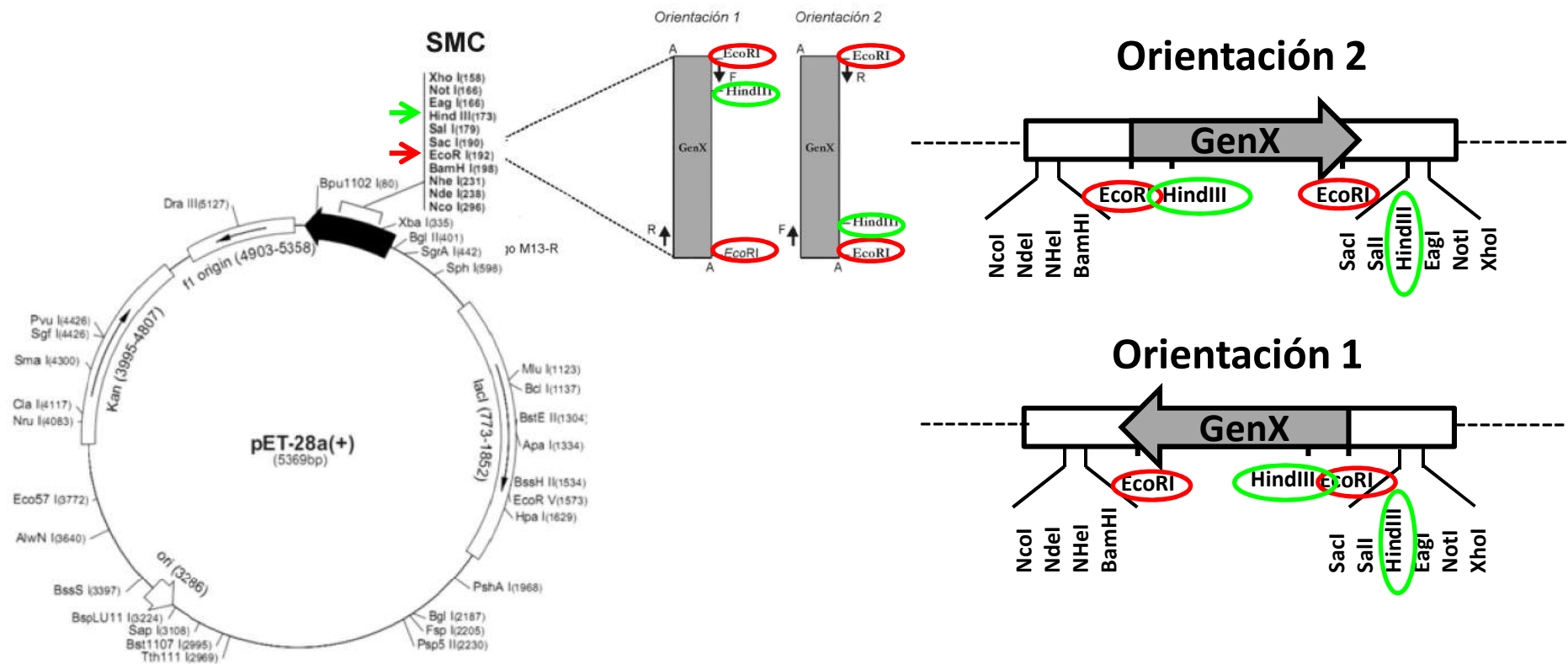
Un **mapa de restricción** es un diagrama de los sitios de restricción conocidos dentro de una secuencia de ADN, indica la posición relativa de los sitios dentro de la secuencia.

Perfil electroforético de los fragmentos de restricción



Mapa de Restricción del ADN

El mapa de restricción de un plásmido permite determinar la orientación de un inserto introducido en un vector de clonado.



Calle 1: Pl con inserto en O2 cortado con HindIII

Calle 2: Pl sin inserto cortado con HindIII

Calle 3: Pl con inserto en O1 cortado con HindIII

Calle 4: Pl sin inserto sin cortar

Calle 5: Pl con inserto sin cortar