

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Introducción

Matriz

Condiciones

Ejemplo

Agarosa

No desnaturalizantes

Análisis restricción
Visualización frag PCR

Desnaturalizantes

Northern blot

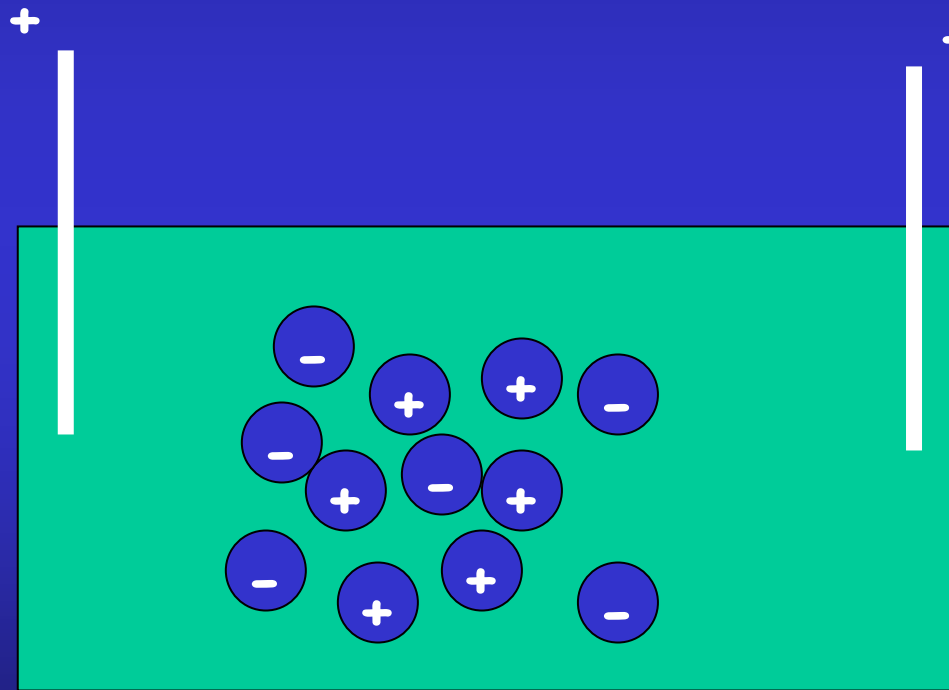
Poliacrilamida No desnaturalizantes

Geles de retardo

Desnaturalizante

Secuenciación

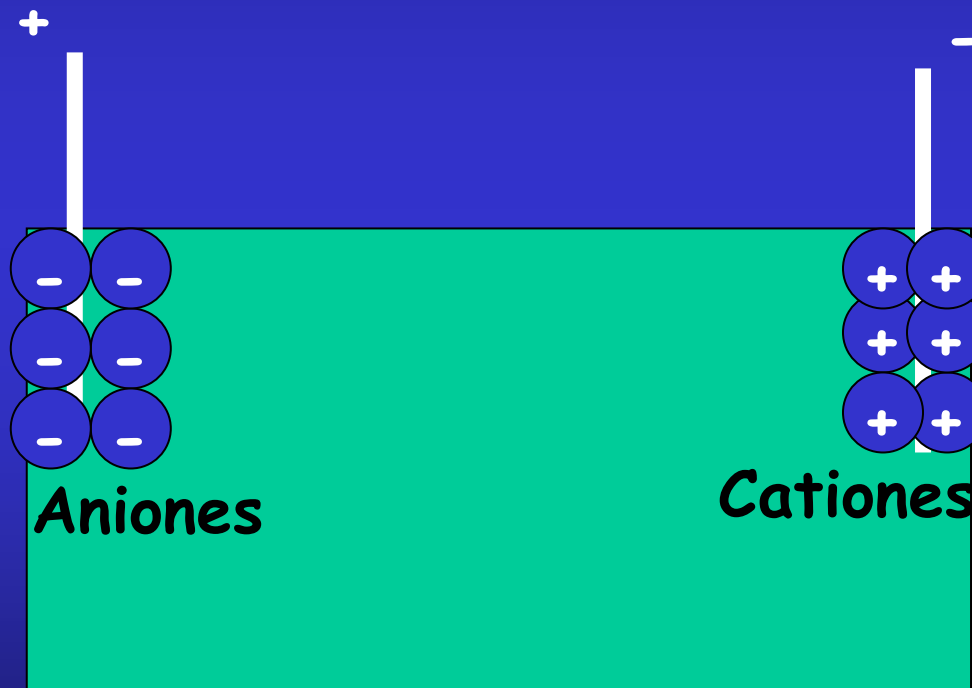
- Electroforesis: transporte bajo la acción de un campo eléctrico
- Soporte: solución (libre), papel, geles sintéticos





ÁNODO

CÁTODO

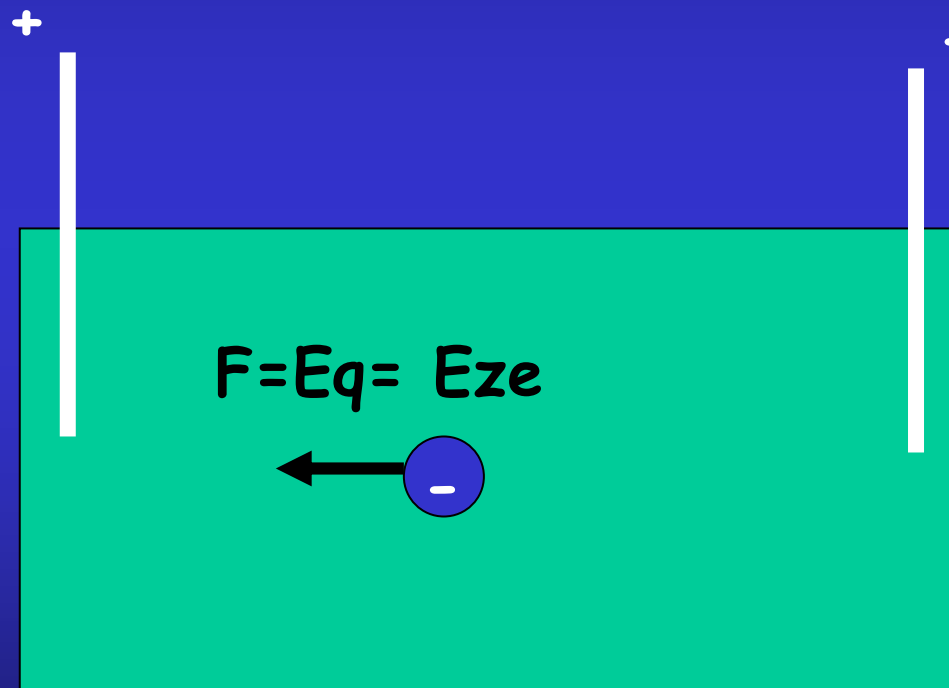


E: Campo eléctrico

q: carga

z: n° cargas netas

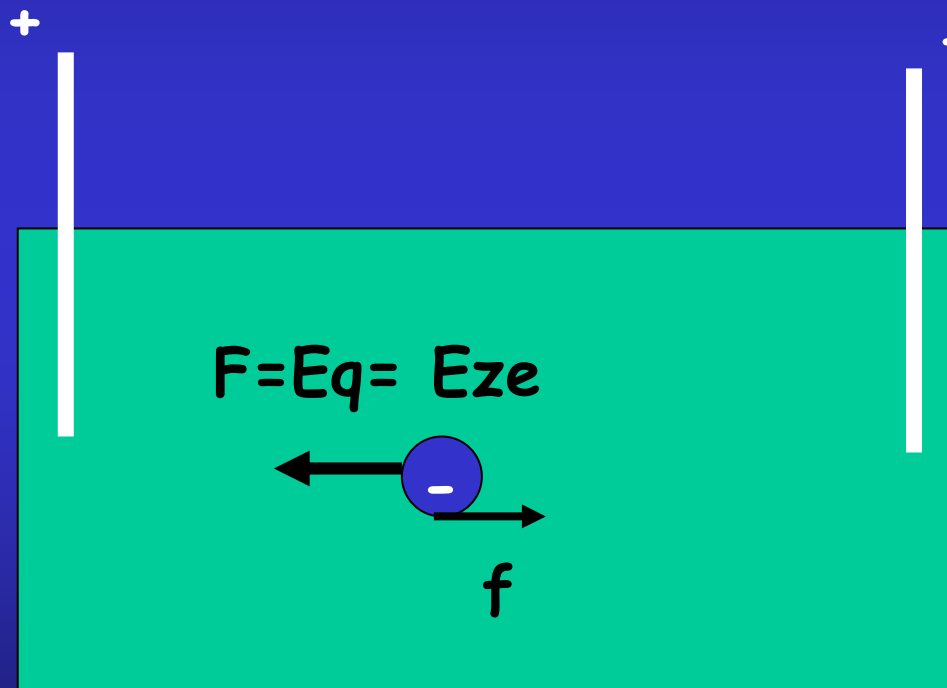
e: carga del electrón



Estado estacionario: $V = Cte$

- Directamente proporcional a F
- Inversamente proporcional a f

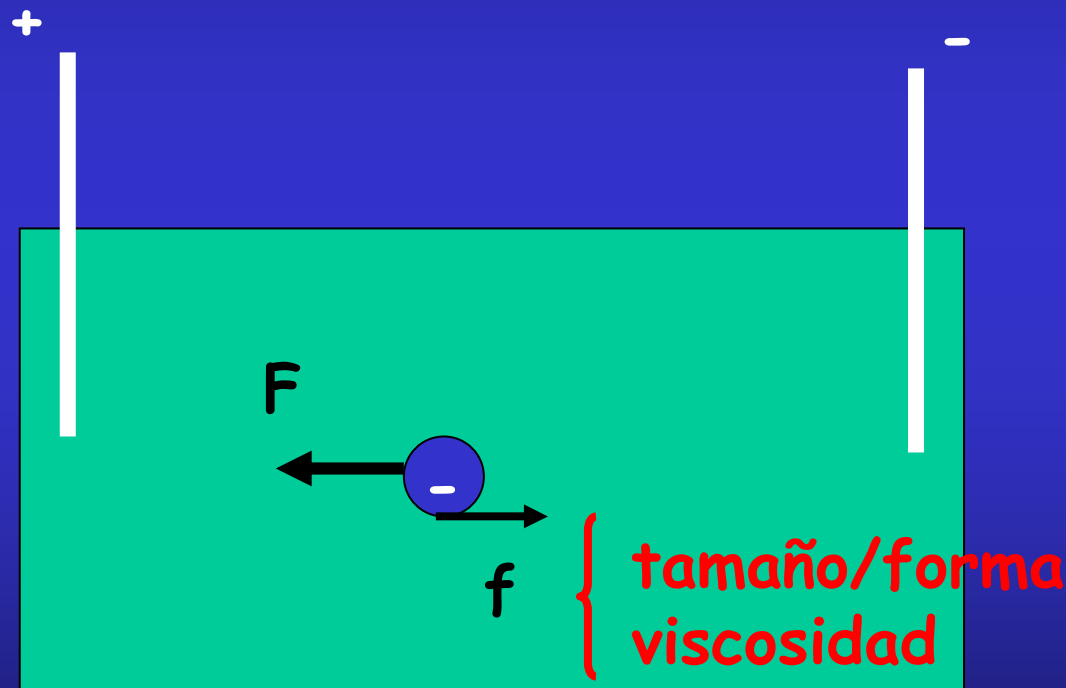
$$V = F/f = Eq/f = Eze/f$$



$$V = F/f = Eq/f = Eze/f$$

r : radio molecular
 ρ : viscosidad del medio

$$V = Eq/6\pi r\rho$$

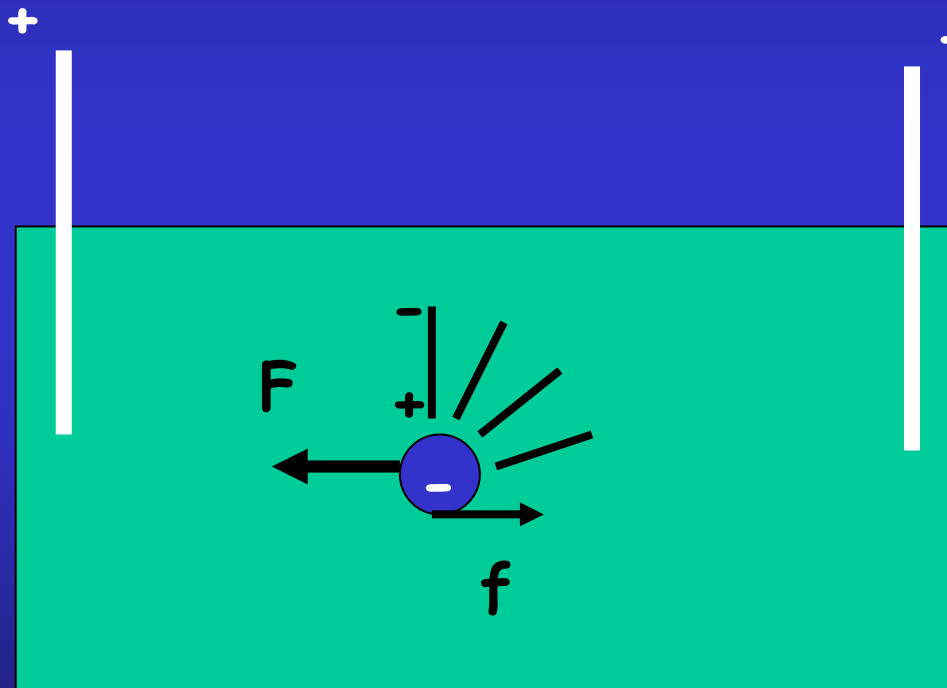


Ley de Stokes
(partículas esféricas)

$$V = Eq / 6\pi\eta\rho \times (\kappa R) / 1 + \kappa R$$

$$V = F/f = Eq/f = Eze/f$$

$$V = Eq / 6\pi\eta\rho$$



Medio acuoso: dipolos que impiden establecer el valor de E
 → **Coeficiente de corrección**

$$V = Eq / 6\pi r \rho \quad X(\kappa R) / 1 + \kappa R$$

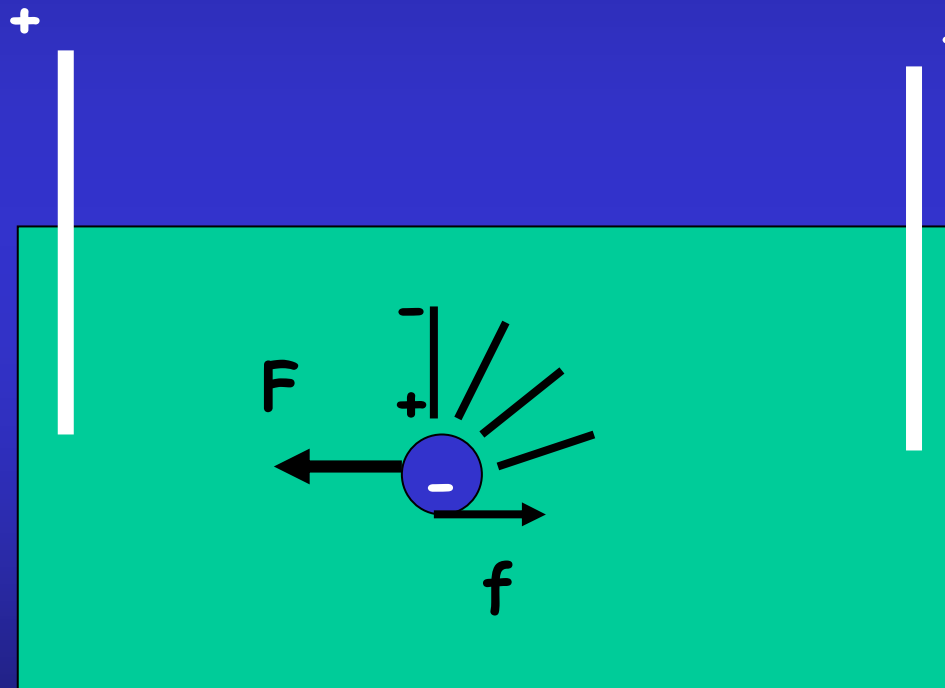
$$\kappa = (8\pi N e^2 / 1000 D k T)^{1/2} I^{1/2}$$

I : fuerza iónica

D : cte dieléctrica

N : n° de Avogadro

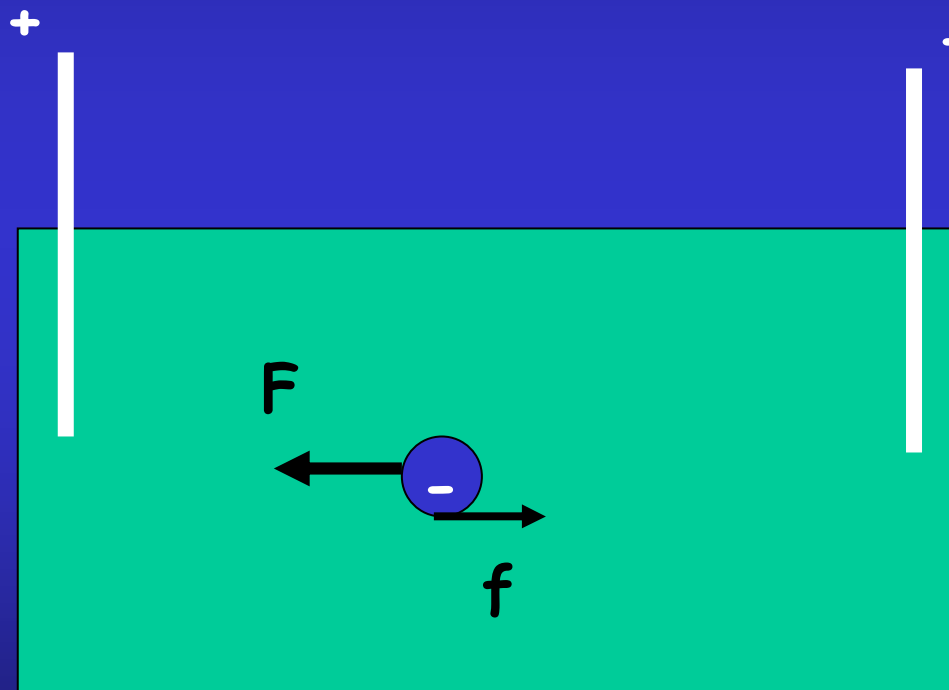
$X(\kappa R)$: Función de Henry
1-1,5



Teoría de Debye-Huckel: naturaleza de E en soluciones de atmósfera iónica

Electroforesis: no se hace en solución, sino en soportes que complican más las ecuaciones descritas (no hay ecuaciones descritas)

-Se utiliza el término movilidad (μ) en lugar de velocidad (V)

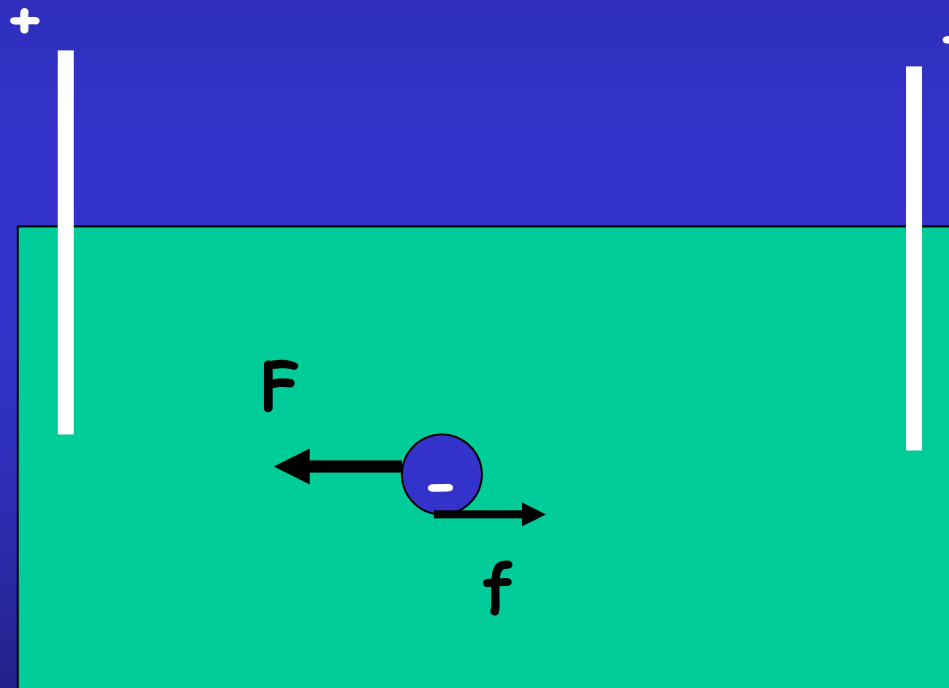


μ : velocidad de migración por unidad de E

$$\mu = V/E = Eq/fE = q/f$$

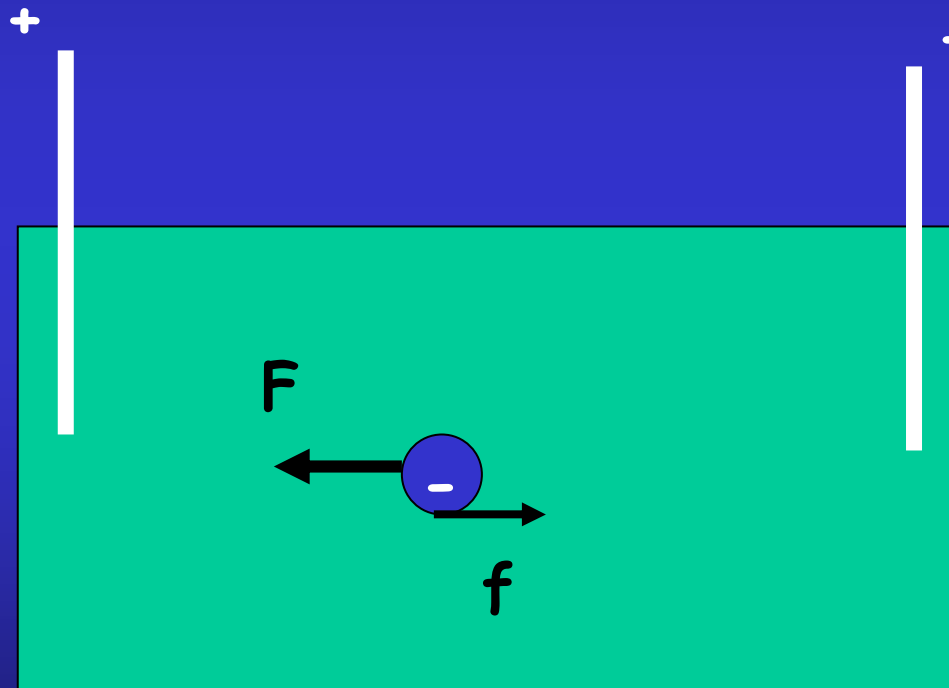
Partículas esféricas:

$$\mu = q/f = q/6\pi\eta r$$

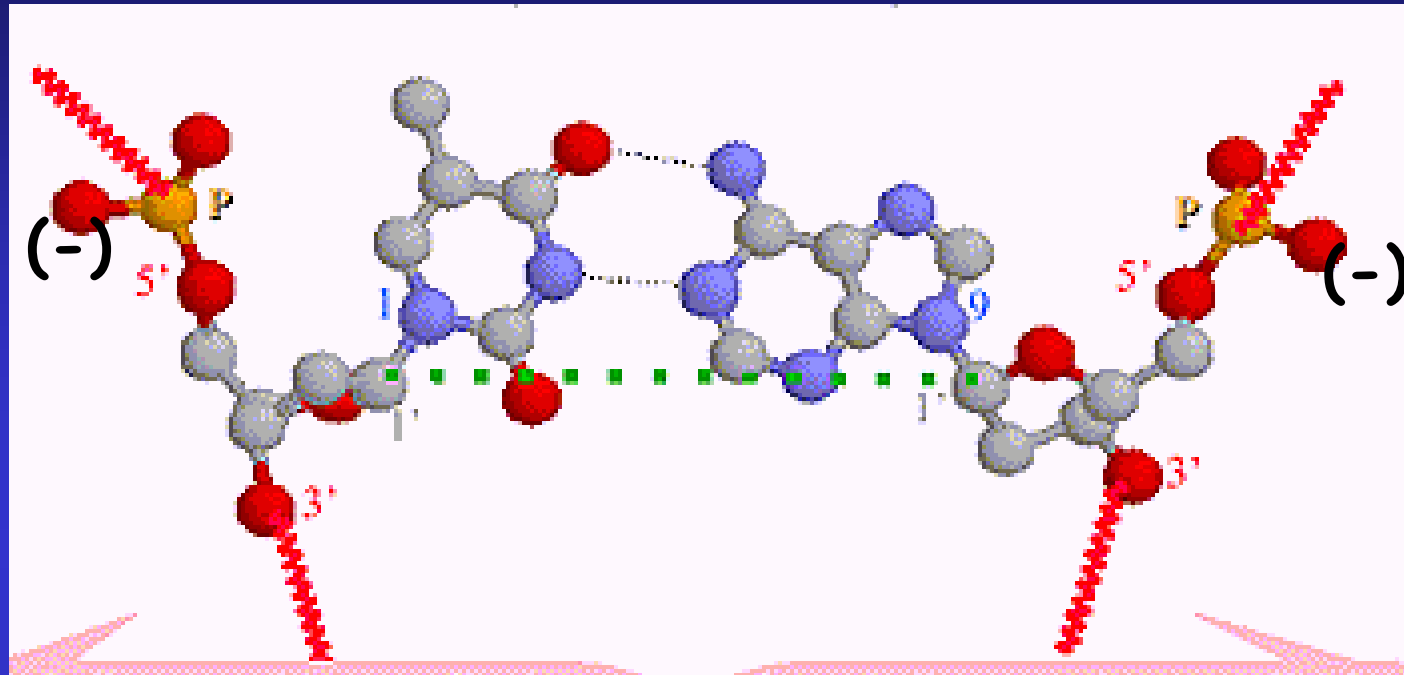


μ : velocidad de migración por unidad de E

No existe una ecuación que describa el comportamiento electroforético en función del radio de la molécula o de su tamaño



μ es directamente proporcional a la carga e inversamente proporcional al tamaño: $\mu = (f) q/m \rightarrow$ **rectas calibración**



pH= 7.4-8

Relación carga/tamaño es igual para todas las moléculas de ácido nucleico → migración a idéntica V
(independiente del tamaño)

El elemento que va a limitar la movilidad será el soporte

Soportes

Agarosa (500 pb-20 kb)

Poliacrilamida (5-500 pb)

Condiciones

Desnaturalizantes

No desnaturalizantes

Movilidad

Tamaño

Conformación/Tamaño

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

Agar (algas)



agarosa + agarpectina

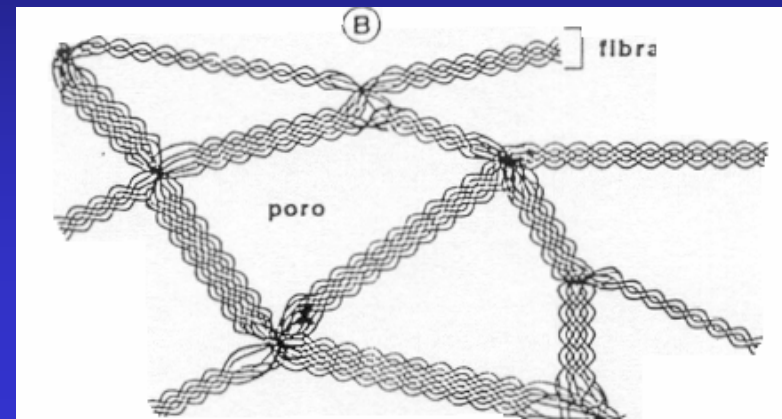


polímero de
agarobiosa (400)



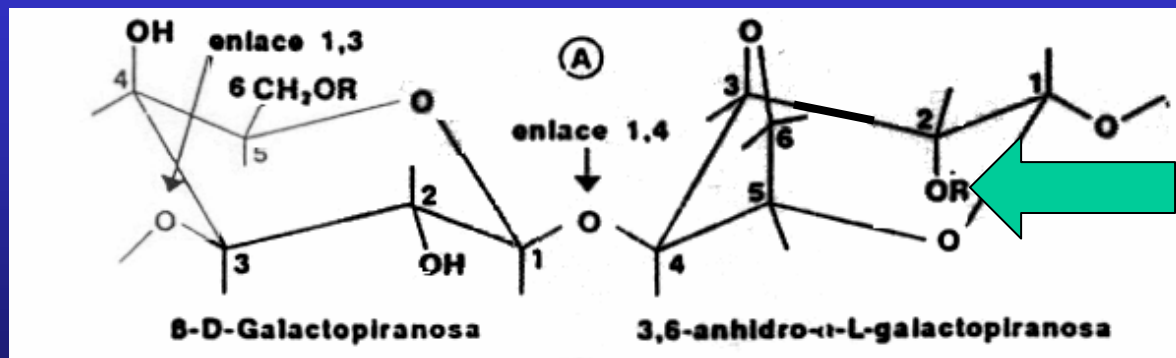
β -D-galactopiranososa (1-4)
3,6-anhidro- α -L-galactopiranososa

No desnaturalizantes



Gel:

Agarosa+tampón
100°C

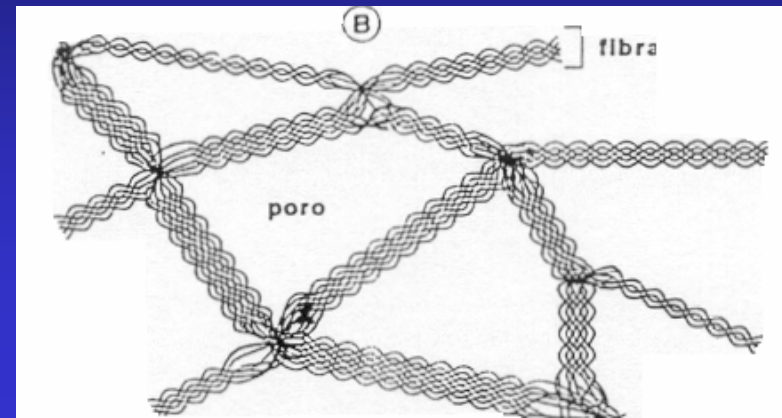


ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes

<u>%Agarosa</u>	<u>kb</u>
0,6	1-20
1	0,4-6
2	0,1-2



Tipos de agarosa:
-Standard: 80-90°C
-Bajo pto fusión: 65°C
R: hidroxietilo

Gel:
Agarosa+tampón
100°C

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

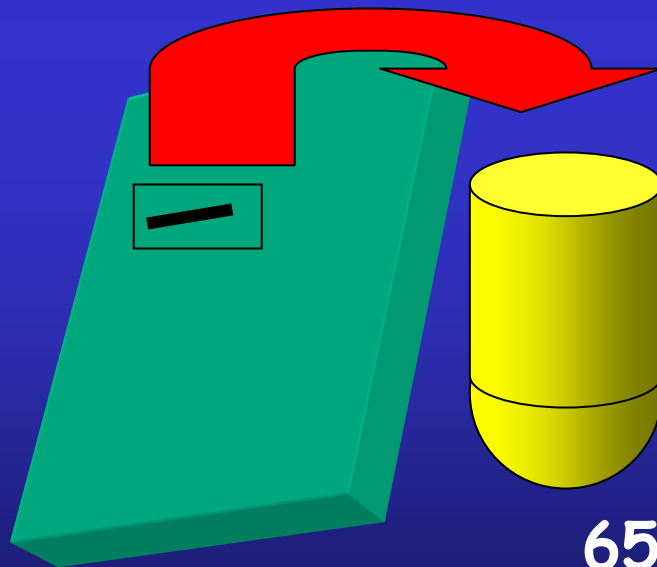
No desnaturalizantes

Tipos de agarosa:

-Standard: 80-90°C

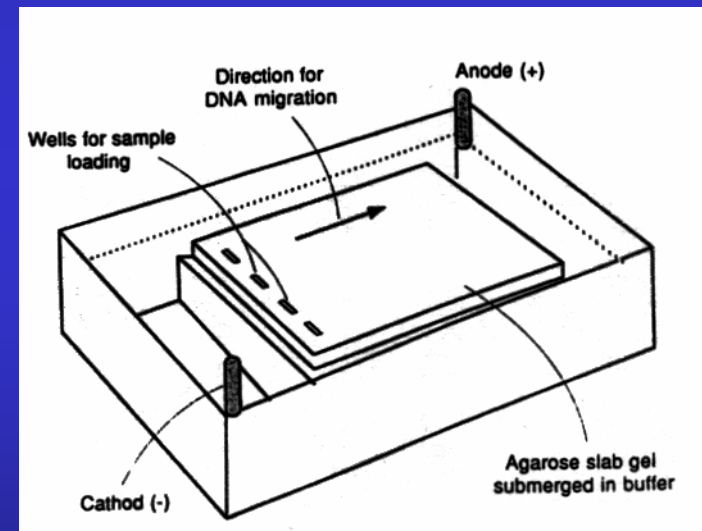
-Bajo pto fusión: 65°C

R: hidroxietilo



65°C

80-90°C

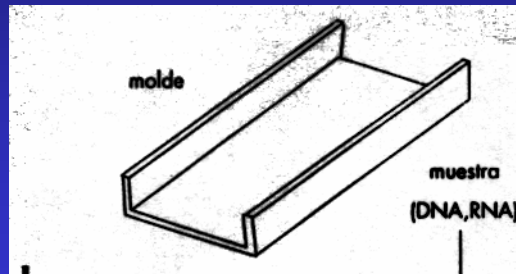


ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

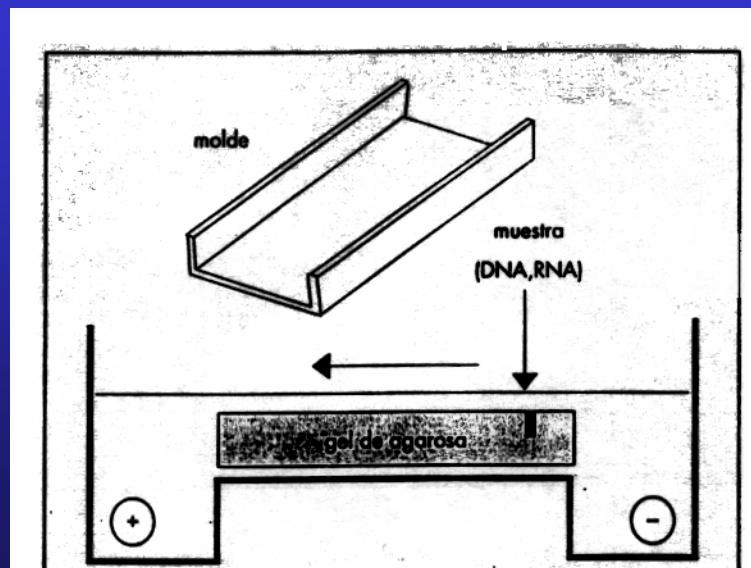
Agarosa

- Agarosa 100°C
- Enfriar

No desnaturalizantes



- Peine → pocillos
- Gelificar



Pocillos cerca del cátodo

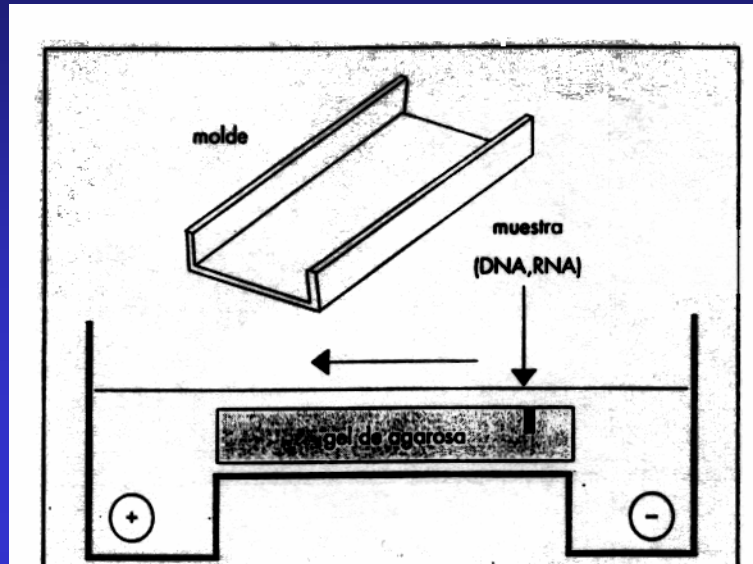
Tampón electroforesis:

TE (10 mM Tris pH=7,4-8
1 mM EDTA)

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes

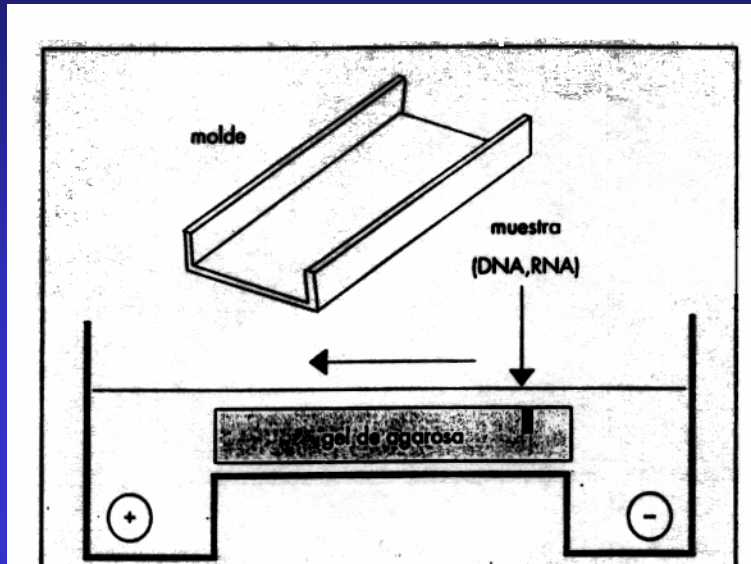


- Cargar la muestra (mín 10 ng):
 - TE:tampón
 - Glicerol, ficoll: ↑densidad
 - Colorantes:
 - Naranja G: 50 pb
 - Azul de bromofenol: 300 pb
 - Xileno-cianol: 4 kb

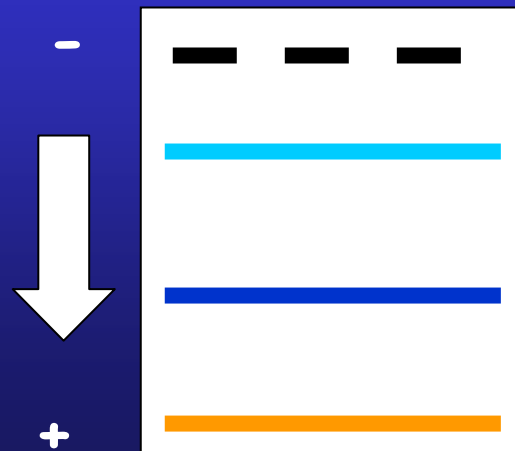
ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes



- Migración 1-10 voltios/cm (entre electrodos)

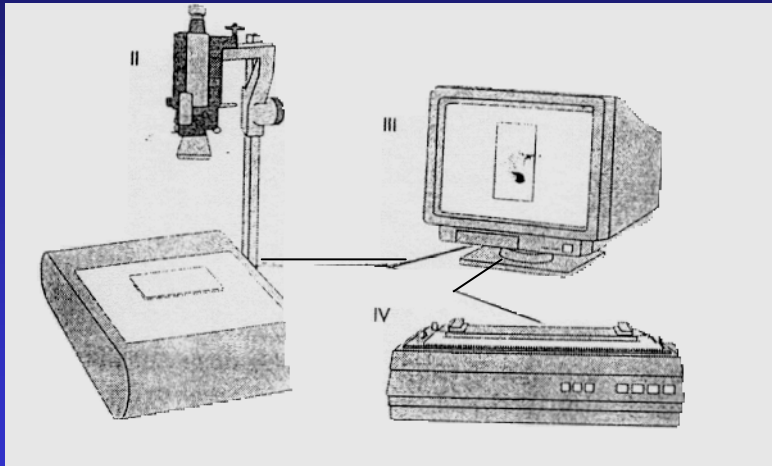


Tinción con
Bromuro de etidio

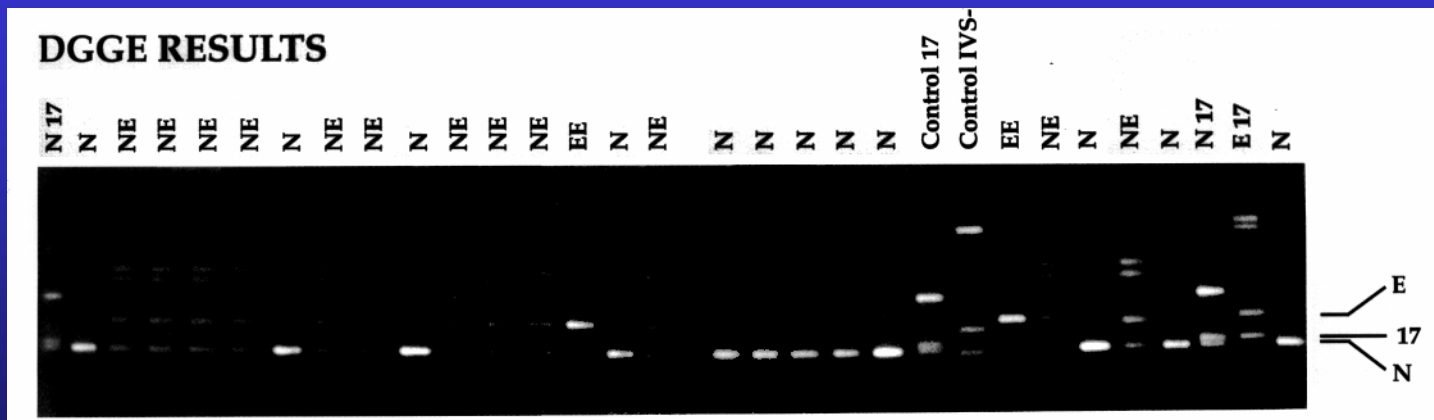
ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes



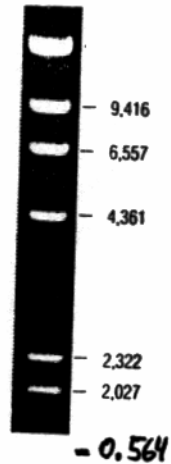
Transiluminador (uv: 302 nm)



ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

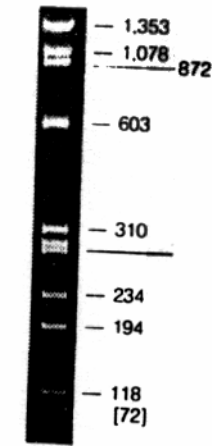
Agarosa

No desnaturalizantes



Lambda DNA-*Hind* III Digest

Marcadores
de peso
molecular



ϕ X174 DNA/*Hae* III Markers:



No desnaturalizantes

Consideraciones:

1- Voltaje: la separación del ADN se hace mejor a bajos voltajes. Para fragmentos pequeños los altos voltajes son mejores, ya que evitan su difusión. Los altos voltajes pueden fundir el gel

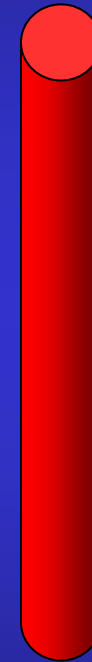
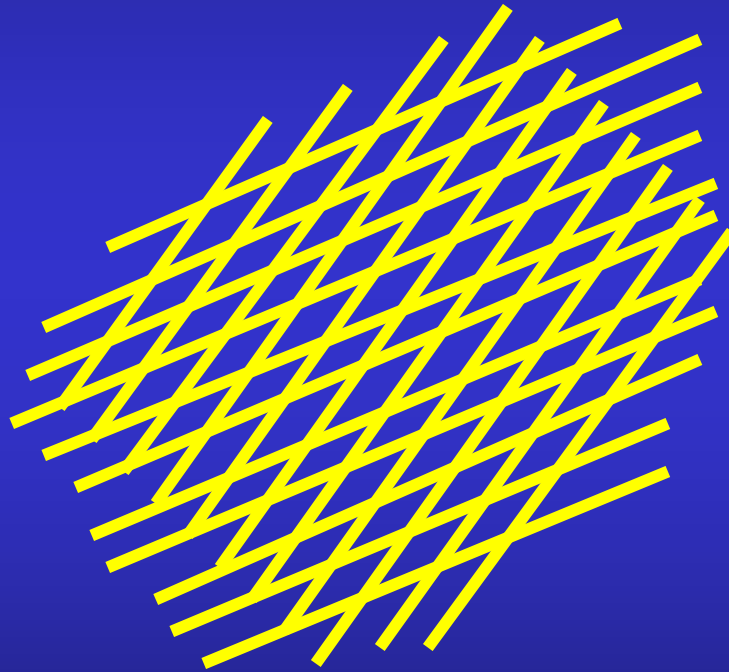
2- Velocidad de migración: tamaño del poro. A altos % de agarosa, poros más pequeños y menor movilidad del ADN

3- Conformación:

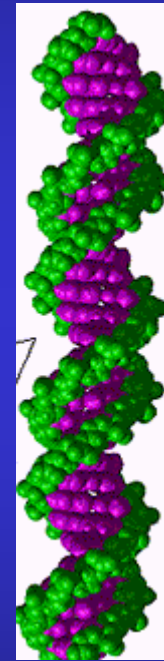
ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes



18Å

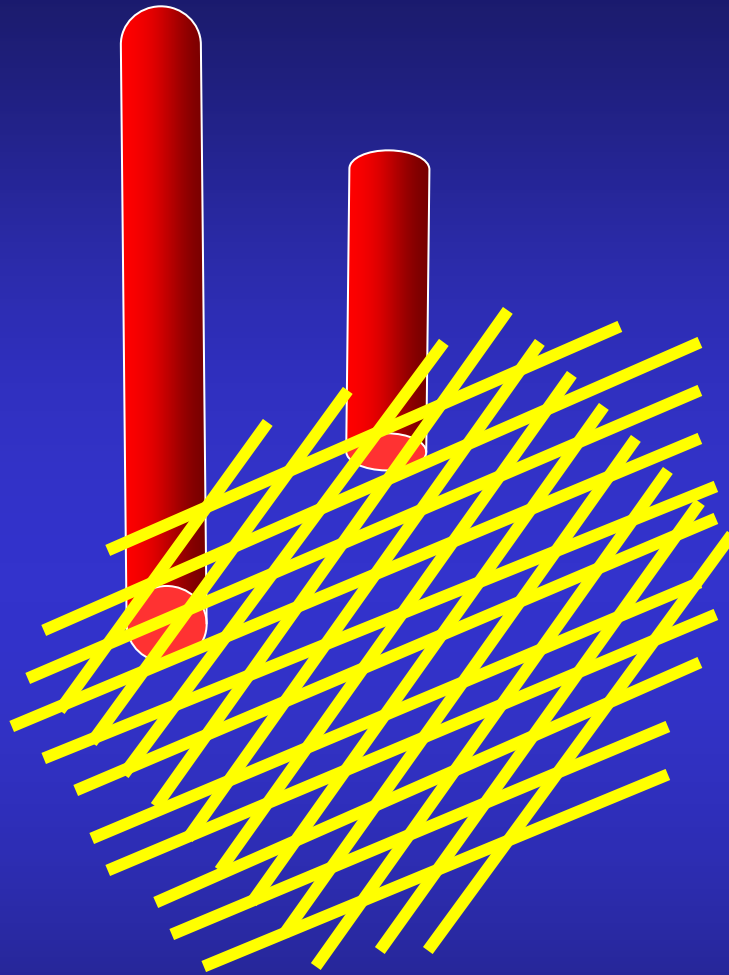


ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes

(-)

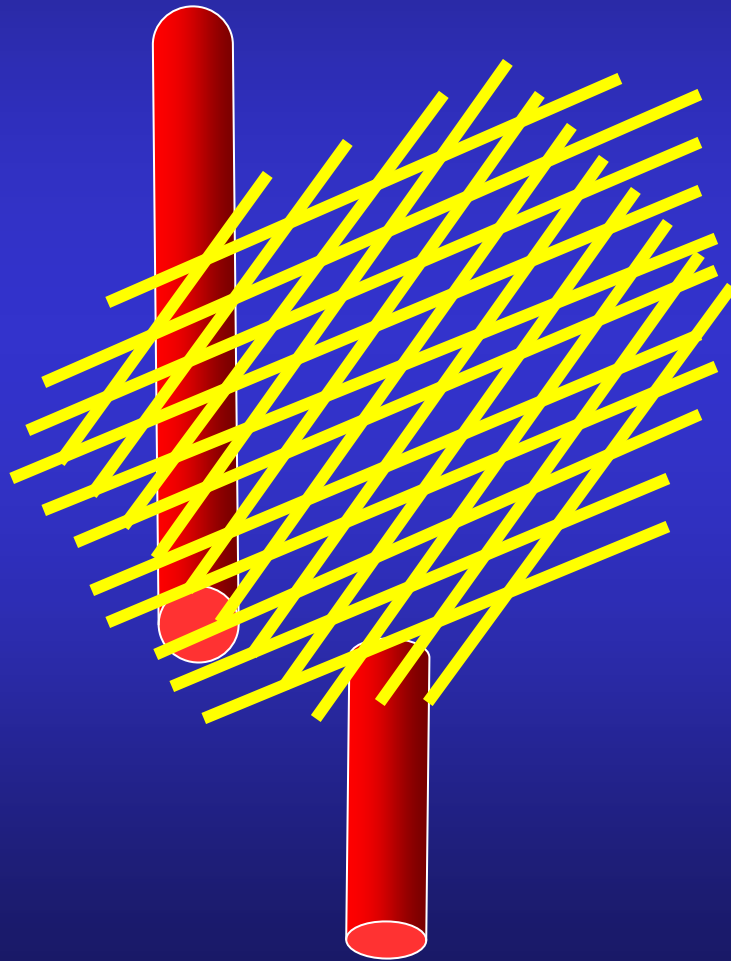


(+)

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes

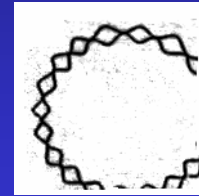
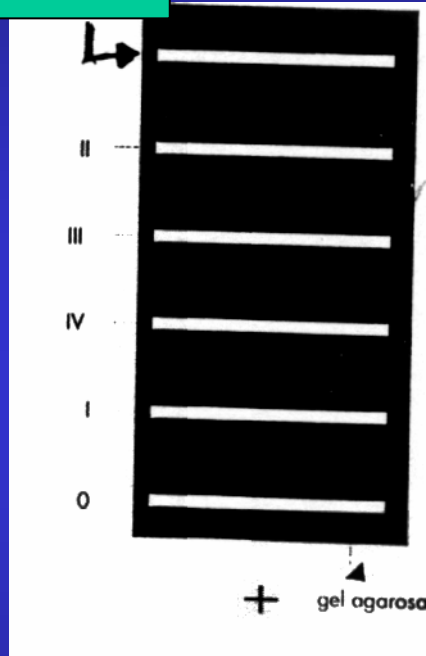


ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

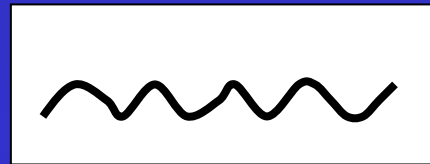
Agarosa

No desnaturalizantes

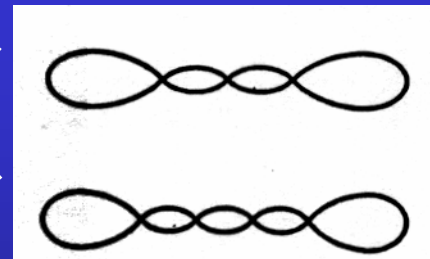
Aplicación de muestra



circular



lineal



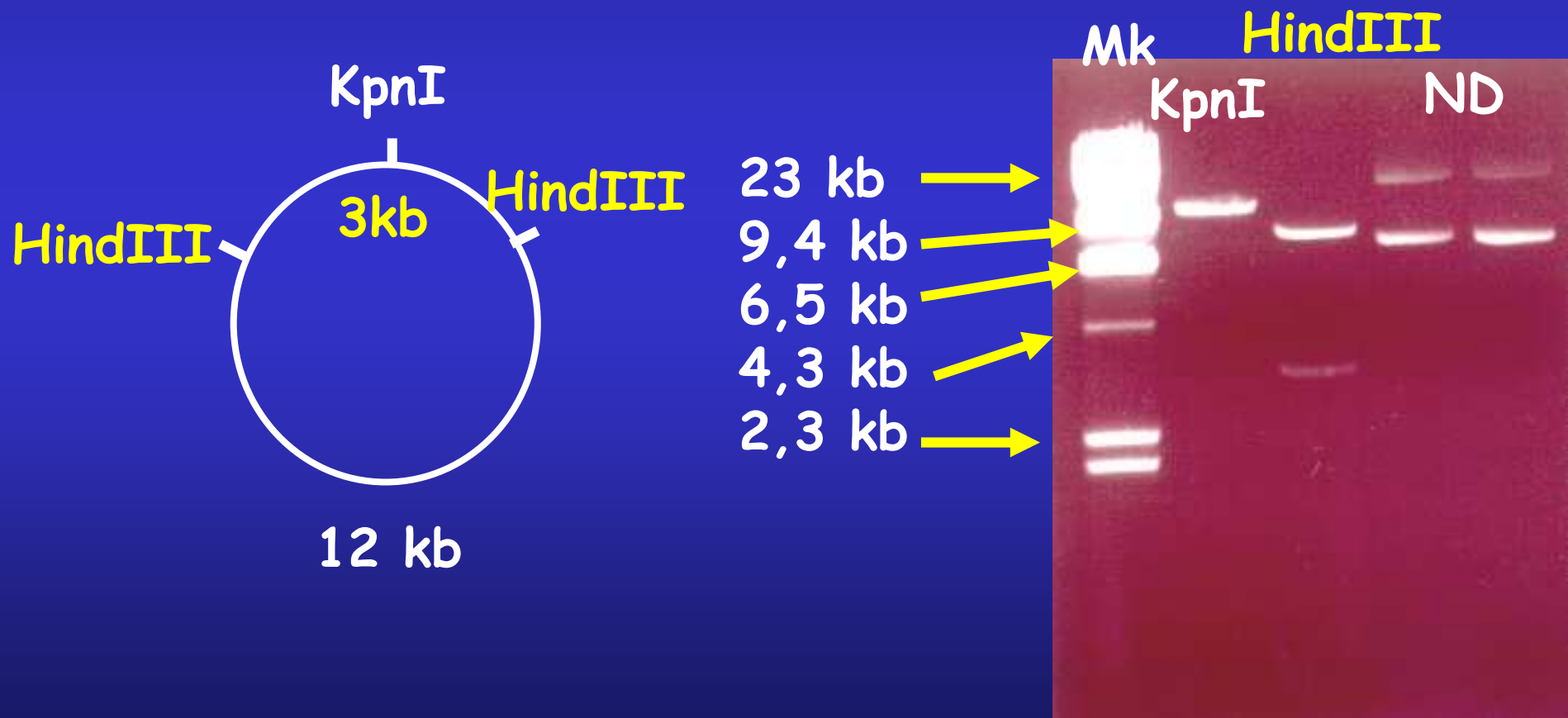
superenrollado

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes

Ejemplo: Análisis de ADN digerido por enzimas de restricción

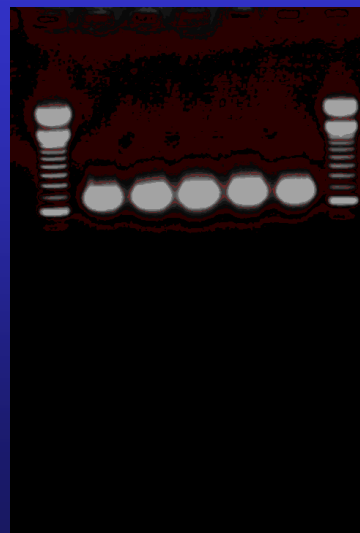
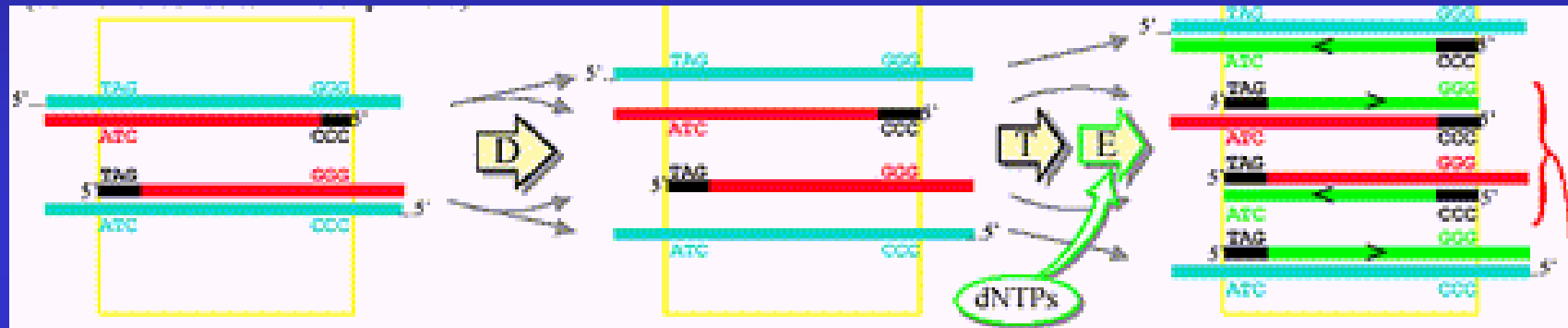


ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

No desnaturalizantes

Ejemplo: Análisis de ADN amplificado por PCR



← 500 bp

Desnaturalizantes

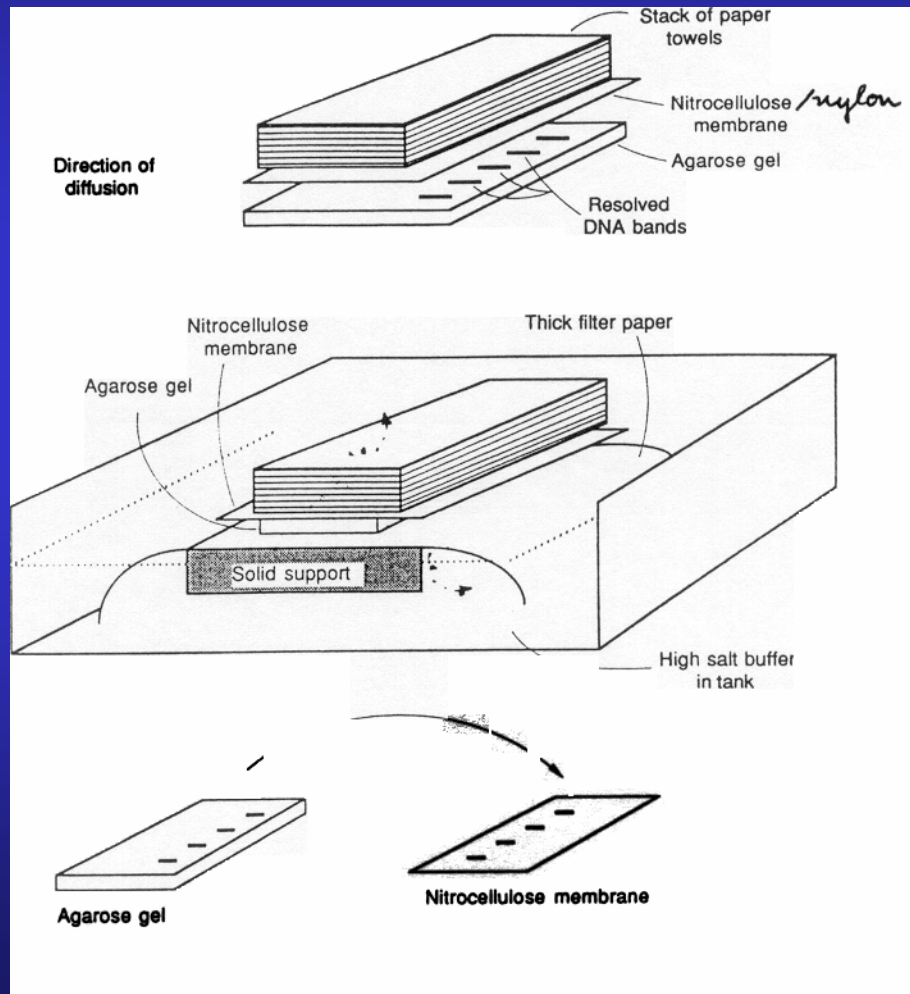
- Montaje gel y migración idem
- ARN: ruptura de los diferentes plegamientos por agentes desnaturalizantes:
 - Urea: rompe ptes de H → disgregaría el gel de agarosa
 - Formamida: idem que urea
 - Glioxal desionizado ($O=CH=CH=O$): unión covalente a G (rompe $G=C$)
50°C/1h
Tampón electroforesis: 10 mM fosfato
Reciclar: evitar cambio pH (la unión del glioxal es reversible)
 - Formaldehído ($O=CH_2$): unión N bases
Tampón electroforesis: 20 mM MOPS
Alta toxicidad

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

Desnaturalizantes

- Ejemplo: Análisis de ARN (Northern blot)



Transferencia

- **Capilaridad** (tamaño intermedio /18h)
- **Vacío** (todo tamaño/2h)
- **Electrotransferencia** (gran tamaño, 2h)

Fijación

- 2h/80°C
- 10 sg/uv (312 nm)

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Agarosa

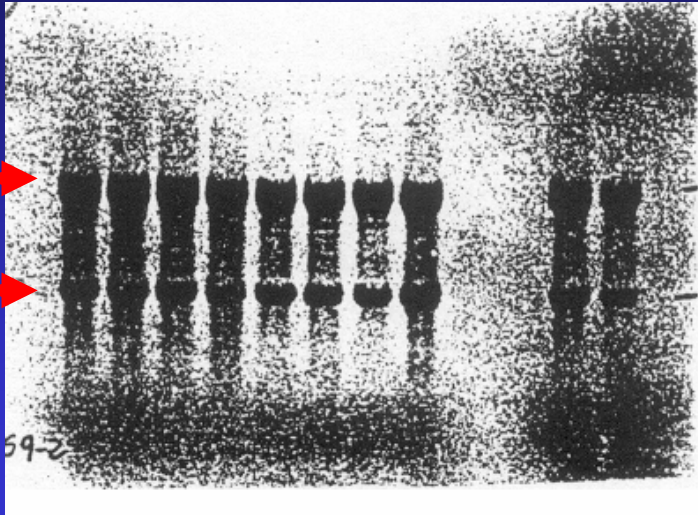
Desnaturalizantes

28S

5Kb

18S

2Kb

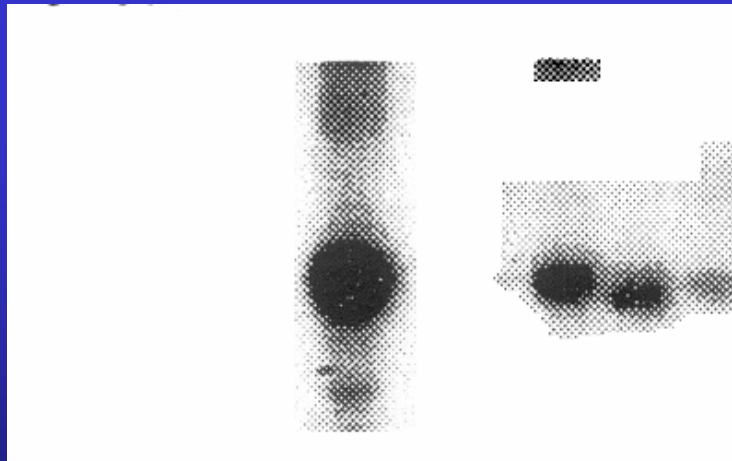


Tinción: azul de metileno

ARN total

ARNm (poliA)

ARN degradado



Hibridación:

- Sonda radioactiva (^{32}P)

- Sonda fluorescente

No desnaturalizantes

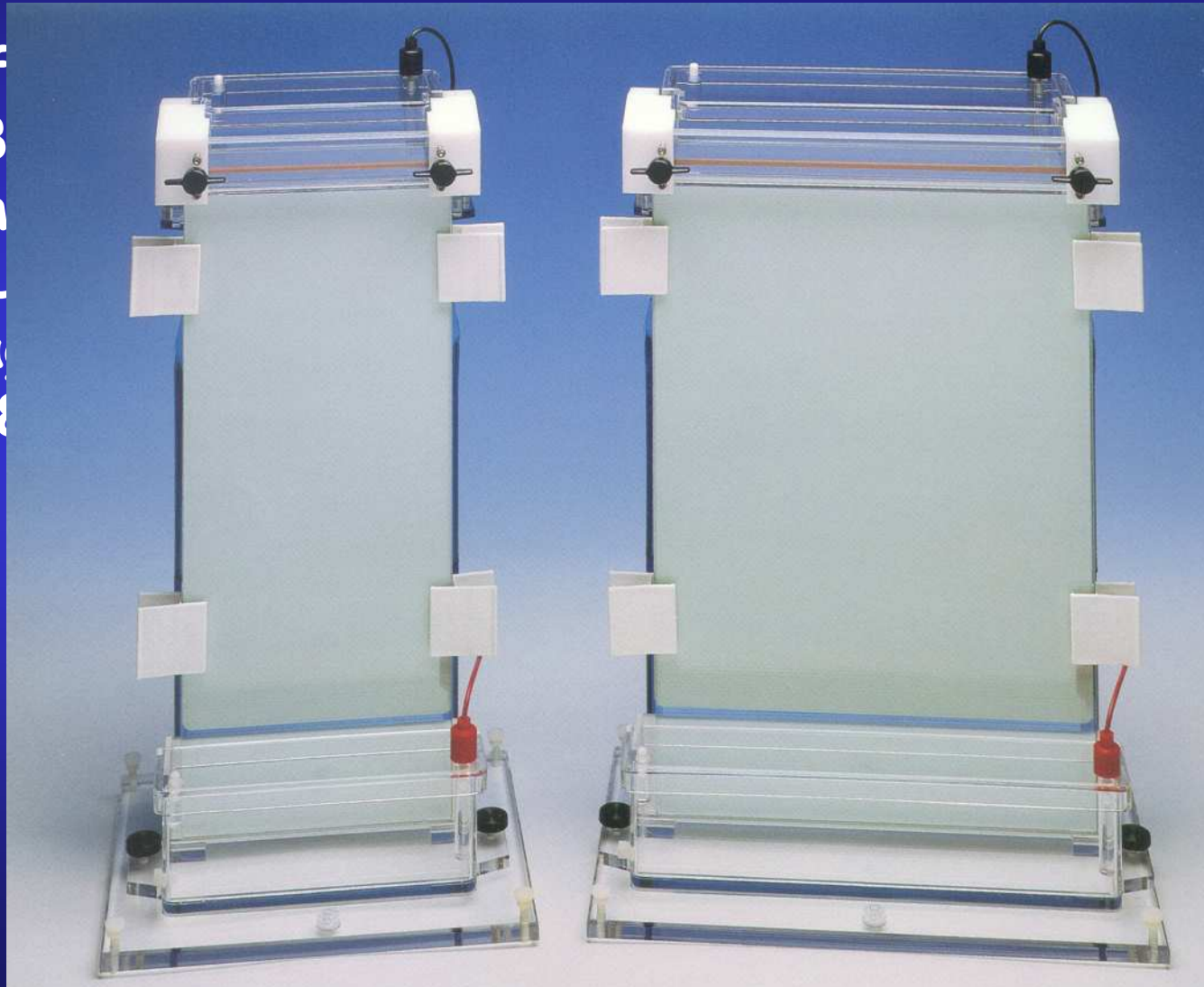
- ADN: fragmentos menores de 500 bp
- Geles 8% poliacrilamida (19 acrilamida: 1 bis-acrilamida)
- Acrilamida es neurotóxica
- No se usa gel concentrante (\neq proteínas)
- Los fragmentos más pequeños migran más rápido
- Mini- (8 cm), midi- (15 cm) y maxi-geles (80-100 cm)

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

No desnaturalizantes

- ADN: f
- Geles 8
- Acrilam
- No se u
- Los fra
- Mini- (8



amida)

cm)

No desnaturalizantes

- Mezcla: Acril/bisacril + TBE + TEMED + persulfato(NH_4)
- Verter entre los 2 cristales (grosor: 0,5-1 mm)
- Peine (almena, dientes) y dejar polimerizar
- Tampón electroforesis (TBE: 90 mM Tris pH=8 + 90 mM ácido bórico + 2 mM EDTA) en contenedores separados
- Cargar muestra (tampón de carga idem) (0,1-2 μg ADN)
- Pre-correr para eliminar impurezas
- Migrar: 1:30h/60 volts (minigeles)
3h/120 volts (midigeles)
3-5h/1500 volts (maxigeles)
- Tinción:
 - Bromuro de etidio
 - Nitrato de plata
 - Autorradiografía (ADN- ^{32}P)

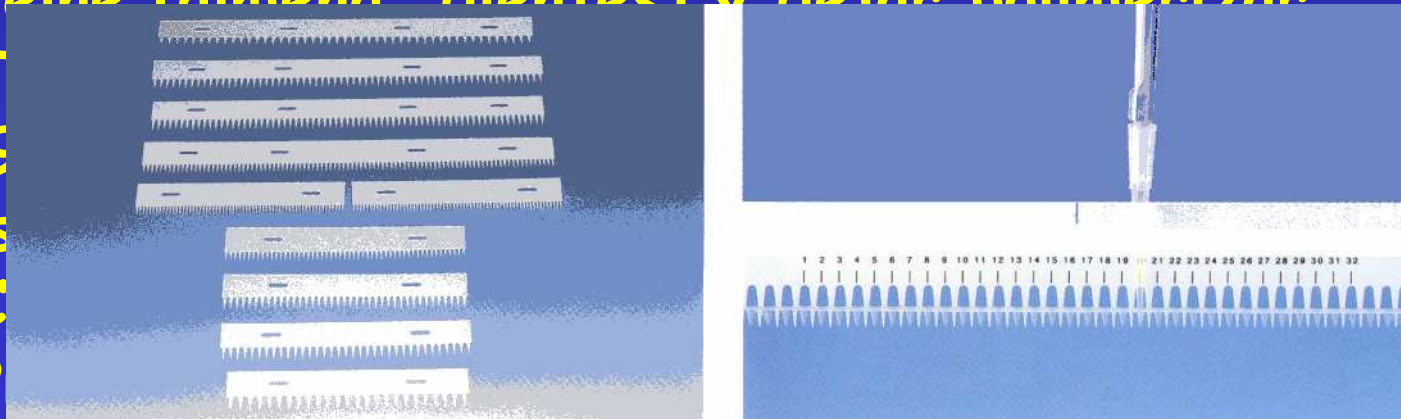
ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

No desnaturalizantes

- Mezcla: Acril/bisacril + TBE + TEMED + persulfato(NH_4)
- Verter entre los 2 cristales (grosor: 0,5-1 mm)
- Peine (almena dientes) y dejar polimerizar

-T
S
S
-C
-P



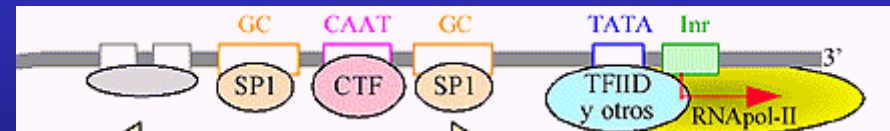
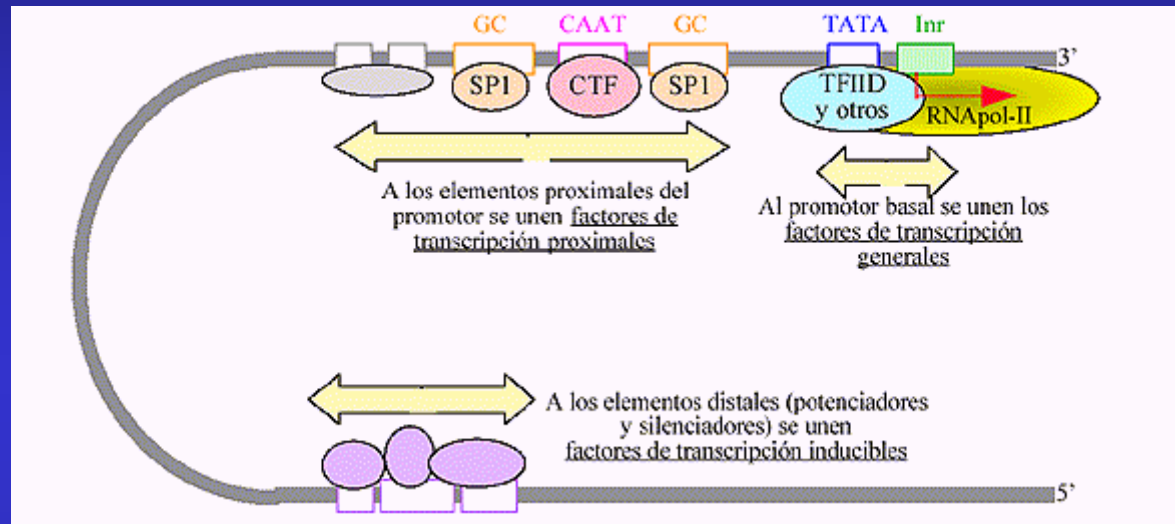
3 +
enedores

2 µg ADN)

- Migrar: 1:30h/60 volts (minigeles)
3h/120 volts (midigeles)
3-5h/1500 volts (maxigeles)
- Tinción:
 - Bromuro de etidio
 - Nitrato de plata
 - Autorradiografía (ADN- ^{32}P)

No desnaturalizantes

Ejemplo: geles de retardo

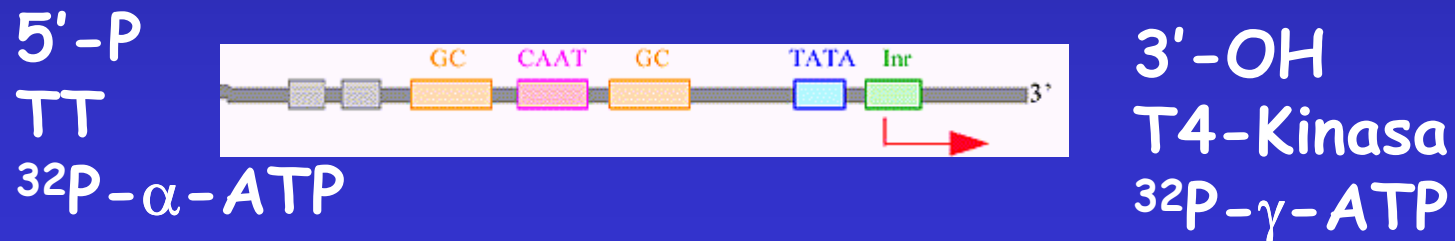


migra más rápido

No desnaturizantes

Ejemplo: geles de retardo

- Marcar el ADN



- Mezclar con extracto de proteínas (factores de transcripción). Unión al ADN es en condiciones no desnaturizantes
- Cargar y migrar el gel
- Secar y autorradiografía

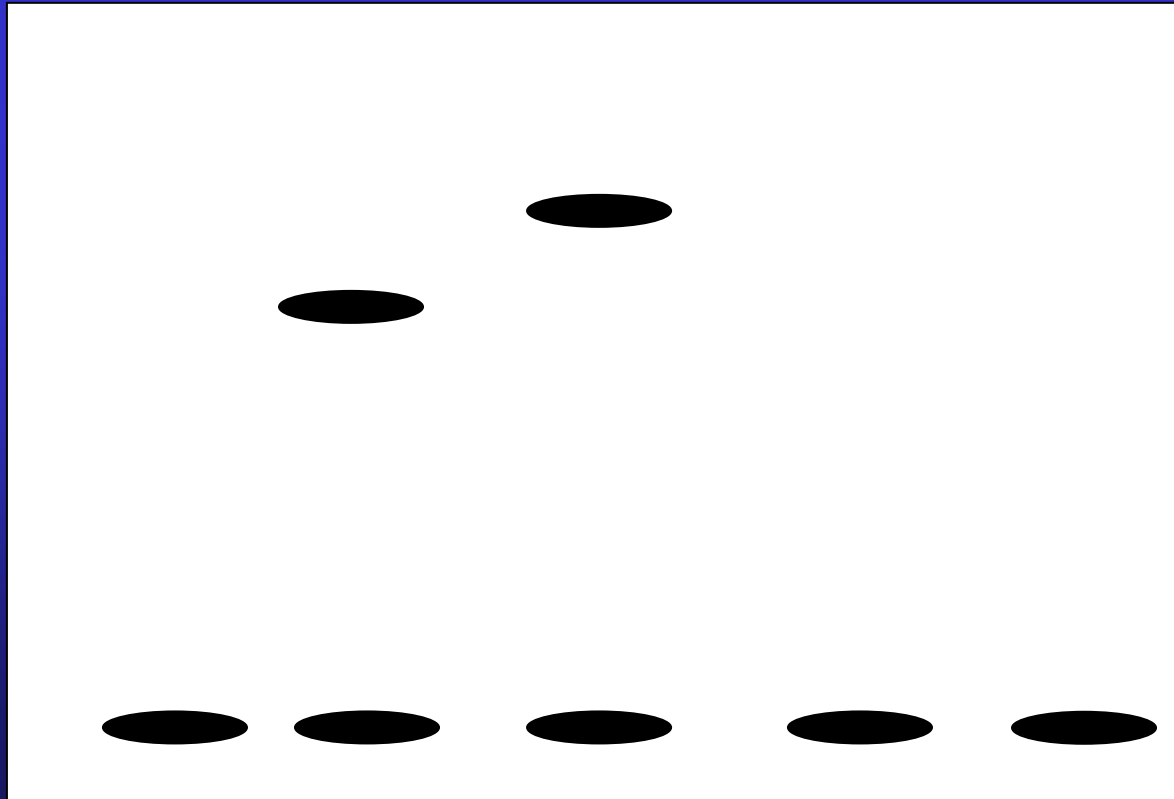
ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

No desnaturalizantes

Ejemplo: geles de retardo

		ADN	ADN	ADN
	ADN	FTx	FTx	FTx
ADN	FTx	Ac	Ac'	ADN frio



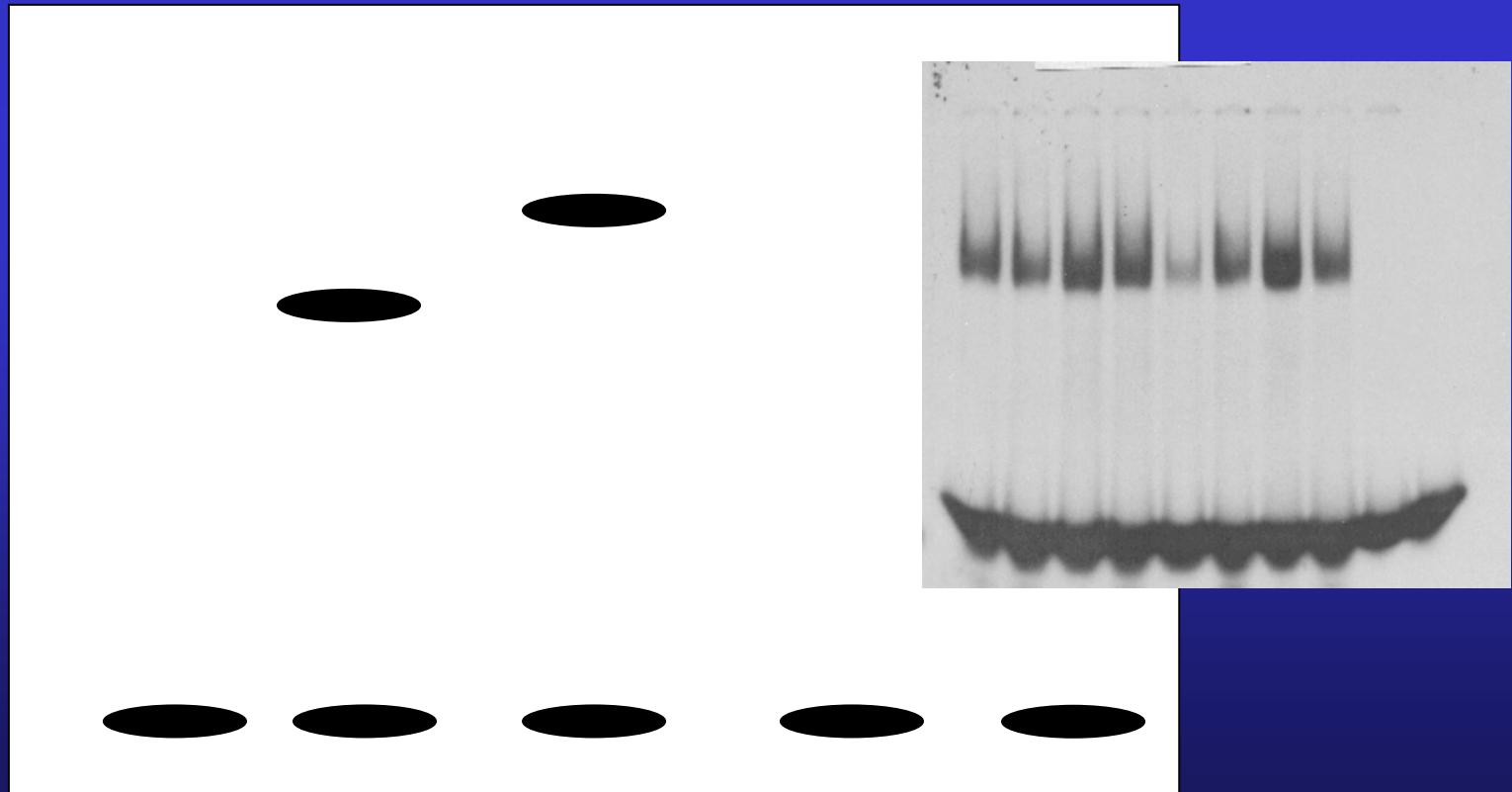
ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

No desnaturalizantes

Ejemplo: geles de retardo

	ADN	ADN	ADN	ADN
	FTx	FTx	FTx	FTx
ADN	FTx	Ac	Ac'	ADN frio

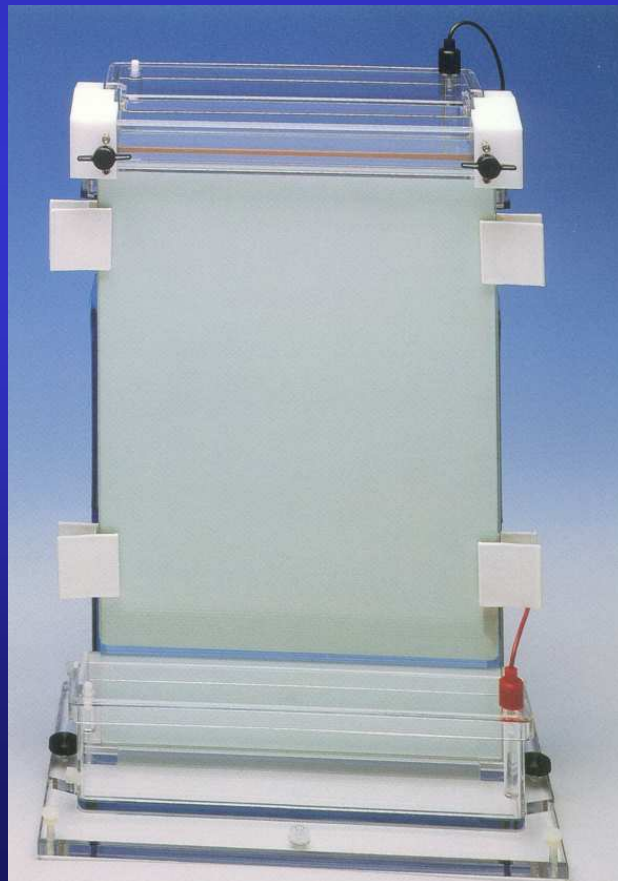


ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

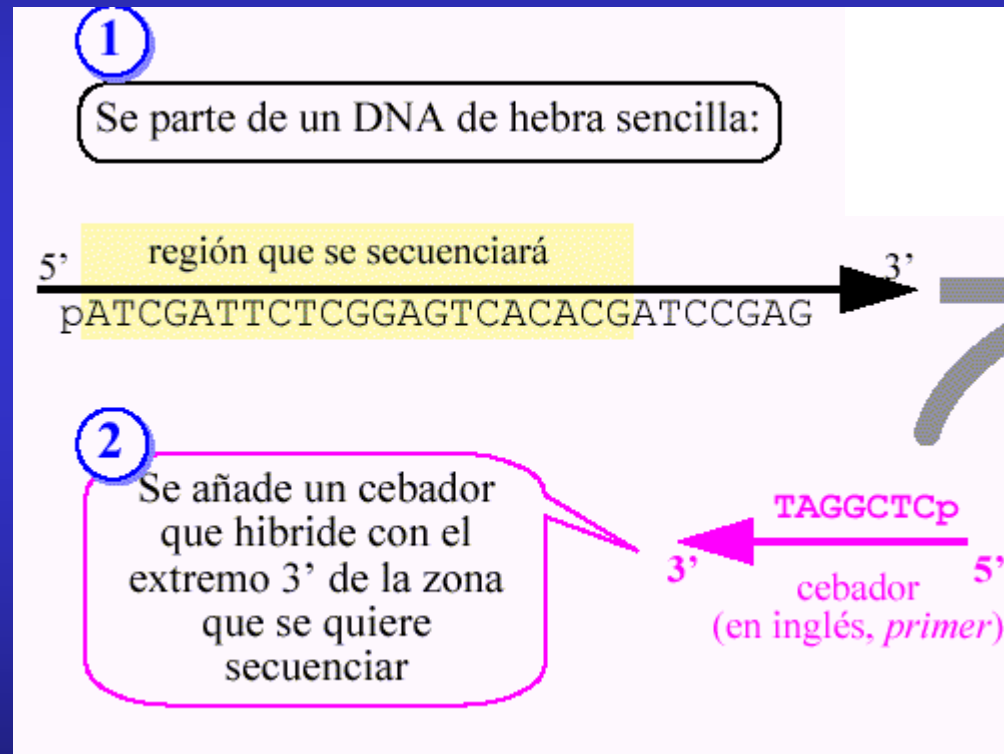
- Separa por tamaño de ADN
- Agentes desnaturizantes: urea, formamida
- La urea se pone en la mezcla del gel (55°C)
- La muestra se desnaturaliza: 90°C/3min
- Tampón de carga: idem + formamida desionizada

Desnaturizantes



- Secuenciación
- Foot-printing

-Ejemplo: secuenciación del ADN

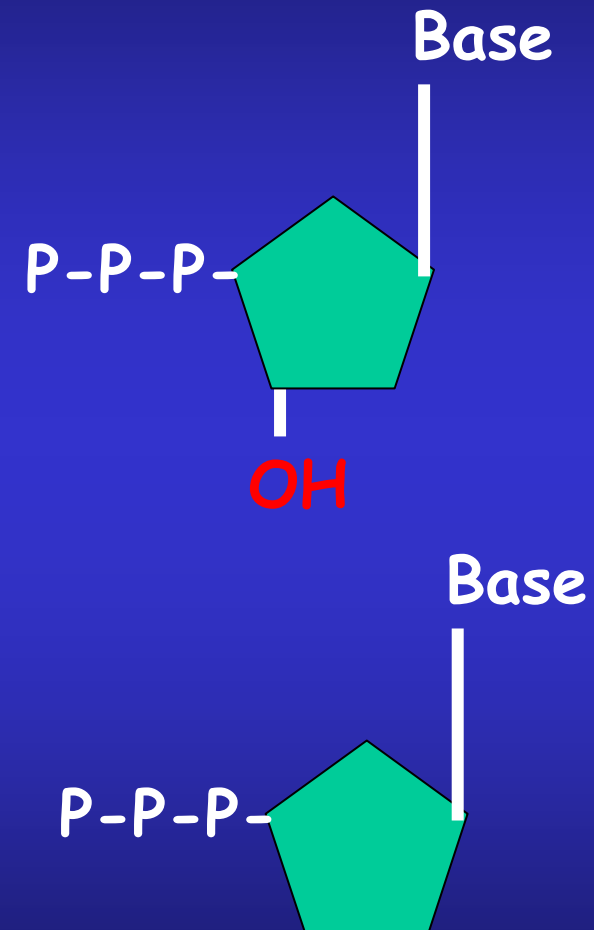
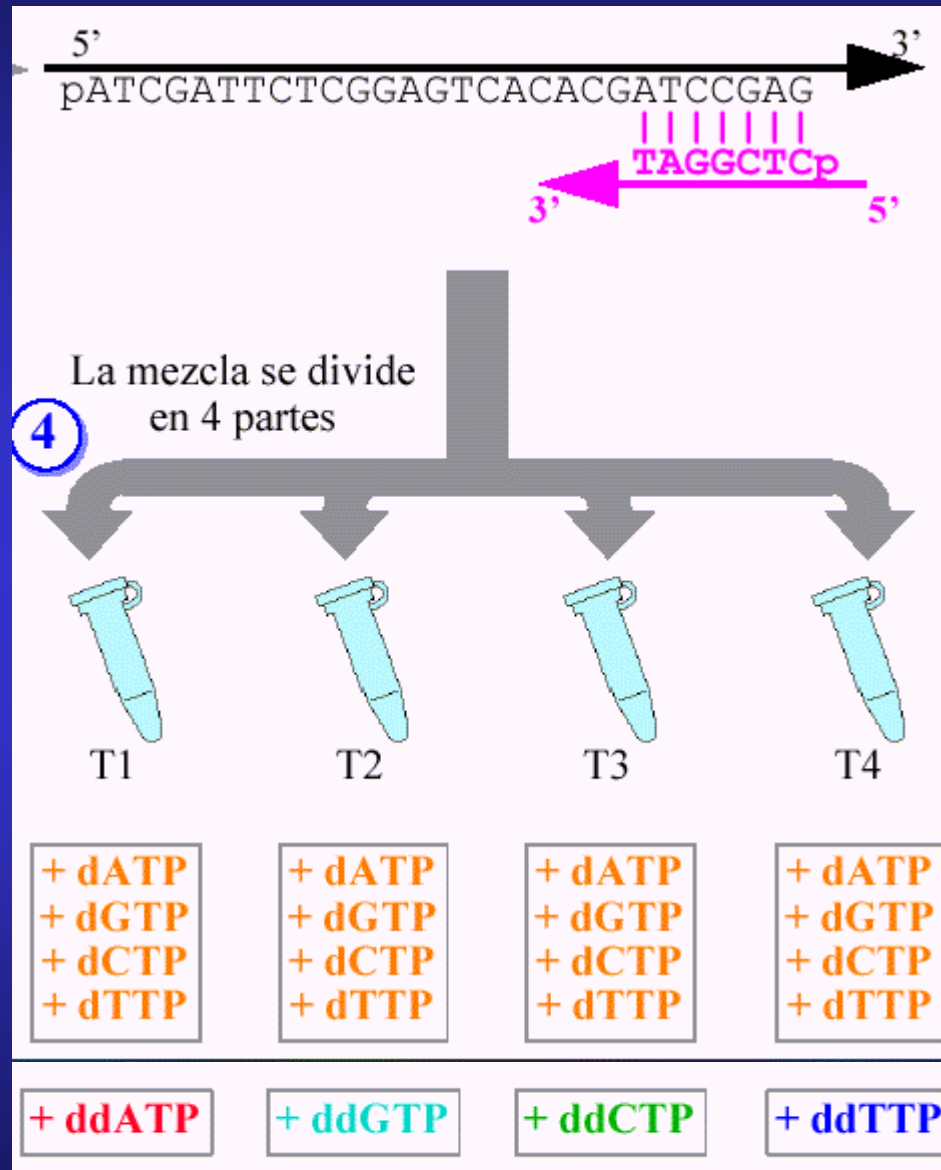


marcado
radiactivamente
32p

ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

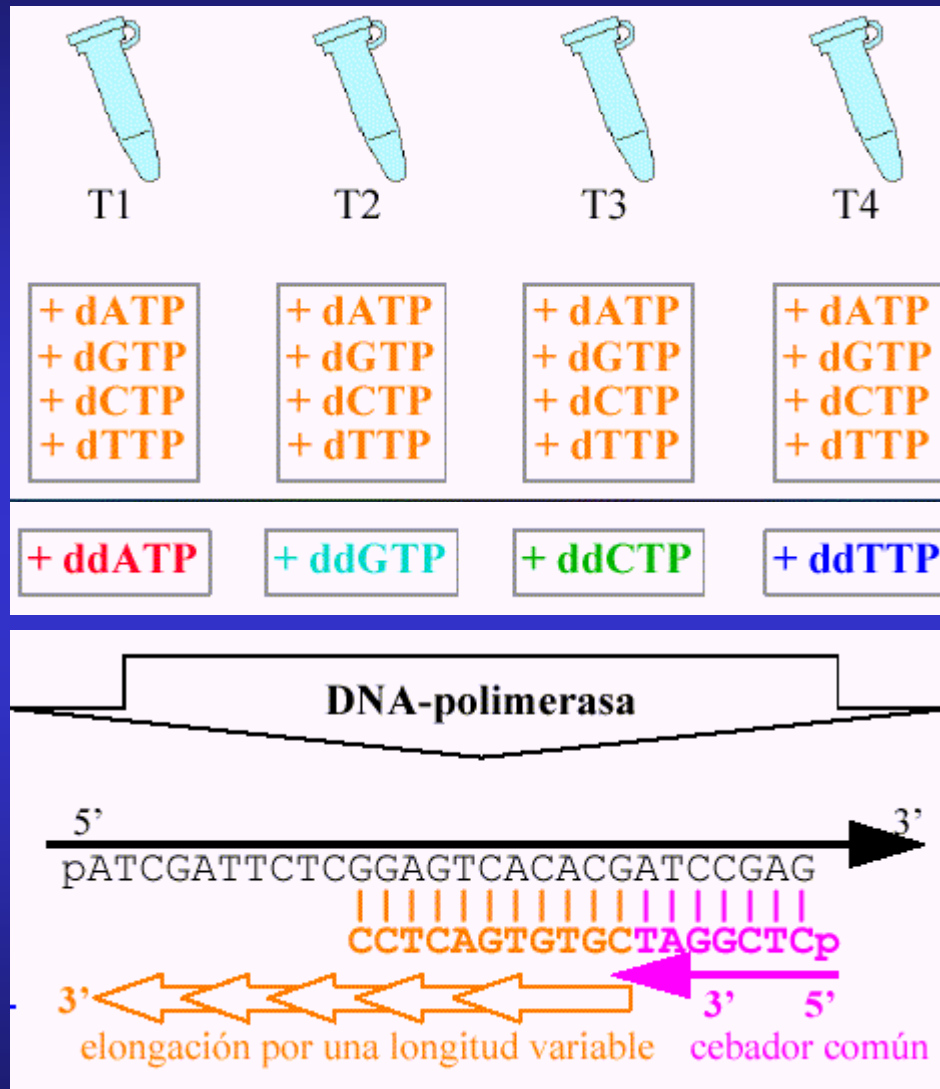
Desnaturalizantes



ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

Desnaturalizantes



ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

Desnaturalizantes



ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS


Poliacrilamida

Desnaturalizantes



T2'
(ddGTP)

pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG GCTAGGCTCp	2+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG GTGCTAGGCTCp	4+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG GTGTGCTAGGCTCp	6+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG GCCTCAGTGTGCTAGGCTCp	12+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG GAGCCTCAGTGTGCTAGGCTCp	14+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG GCTAAGAGCCTCAGTGTGCTAGGCTCp	19+7



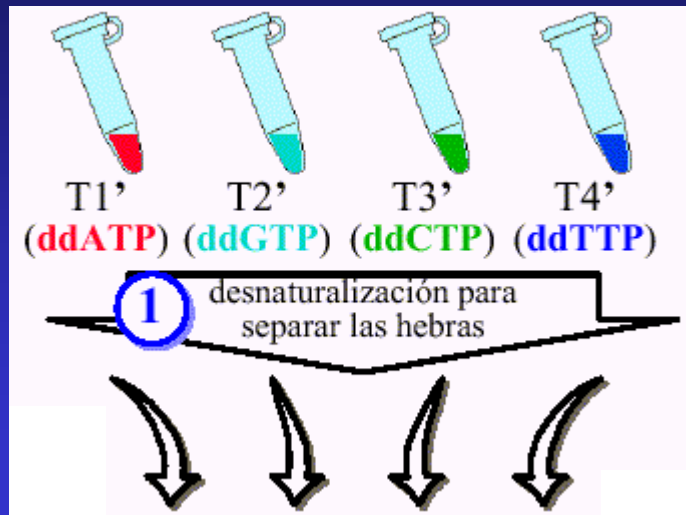
T4'
(ddTTP)

pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG TGCTAGGCTCp	3+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG TGTGCTAGGCTCp	5+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG TCAGTGTGCTAGGCTCp	9+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG TAAGAGCCTCAGTGTGCTAGGCTCp	17+7
pATCGATTCTCGGAGTCACACGATCCGAG TAGCTAAGAGCCTCAGTGTGCTAGGCTCp	21+7

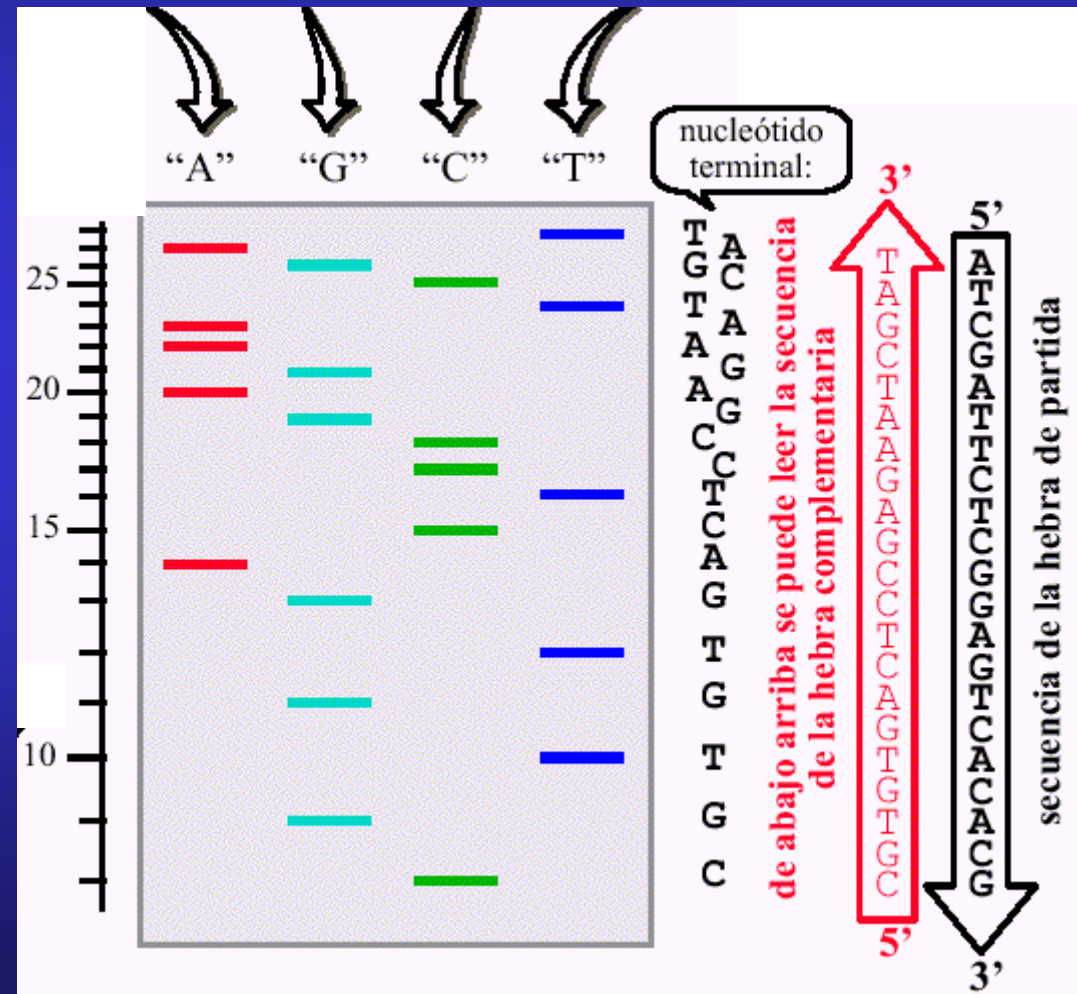
ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

Desnaturalizantes



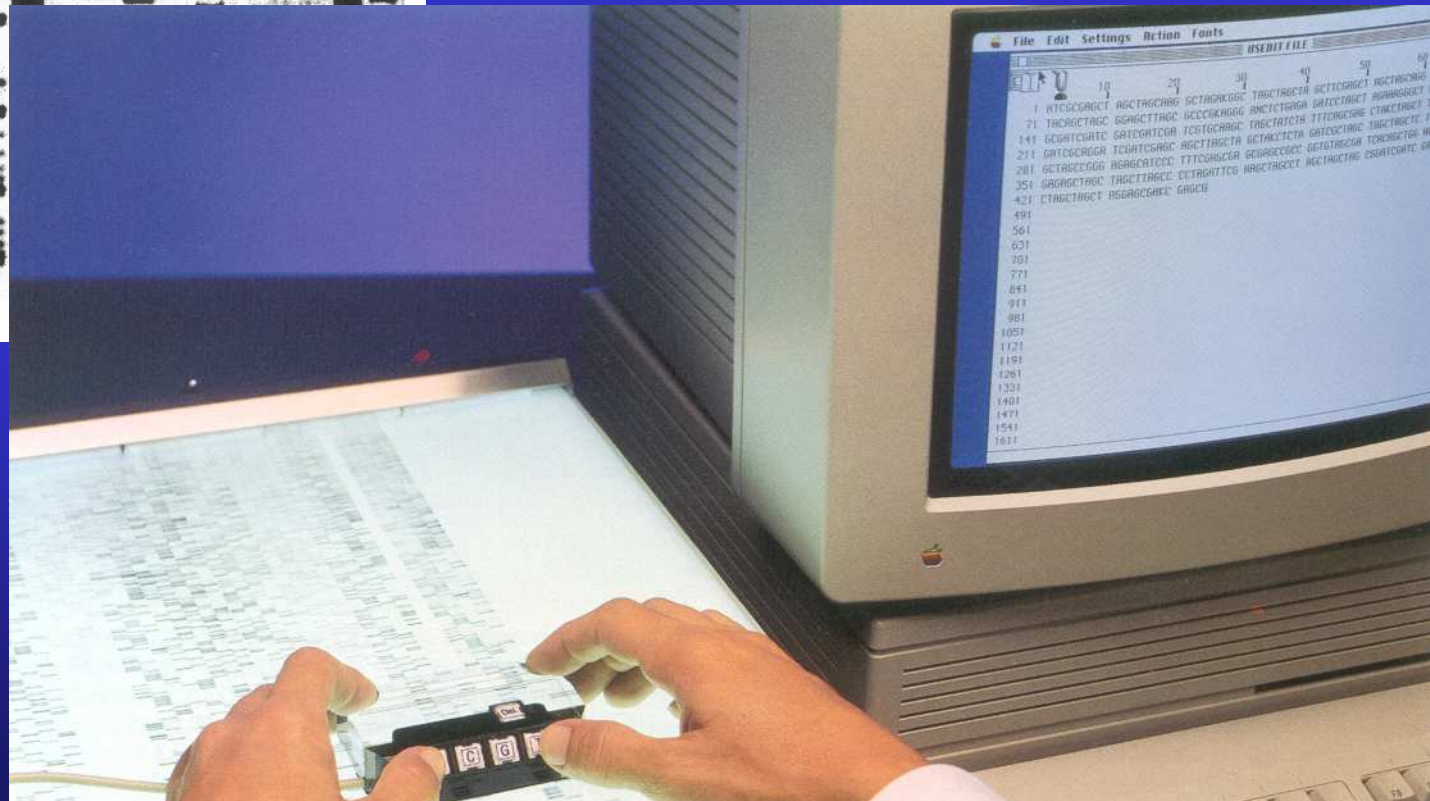
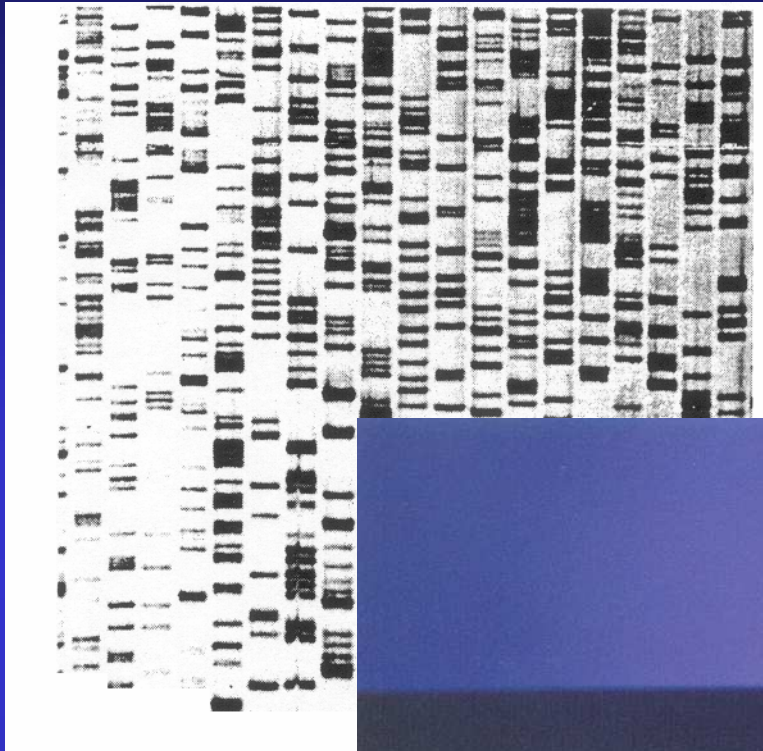
GEL



ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

Desnaturalizantes



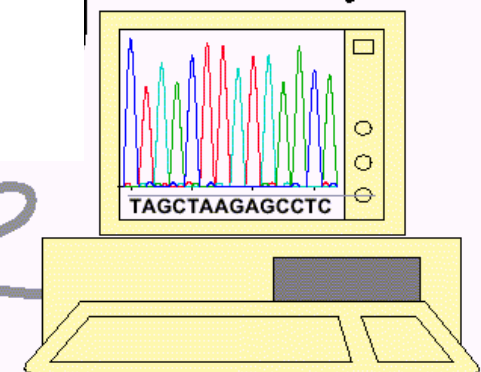
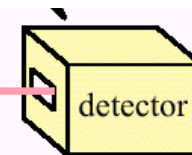
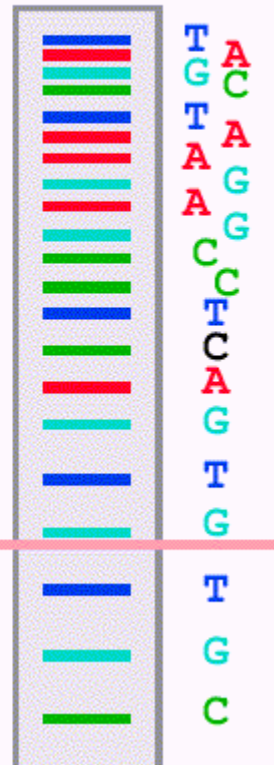
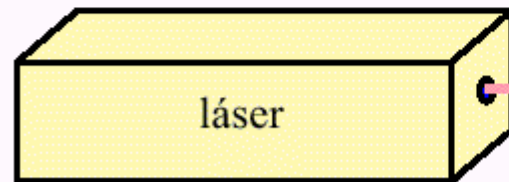
ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

Poliacrilamida

Desnaturalizantes



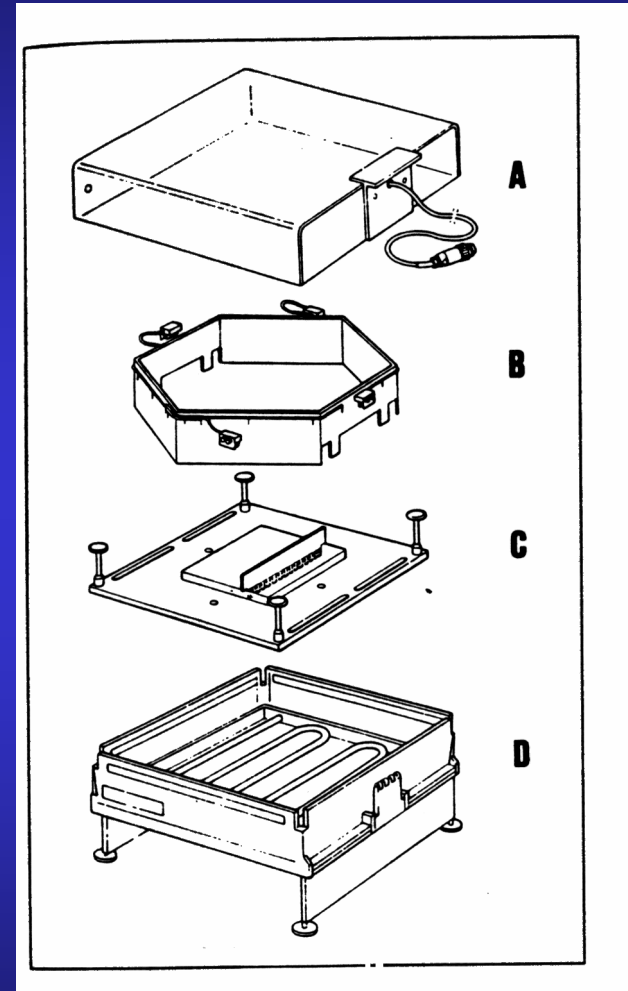
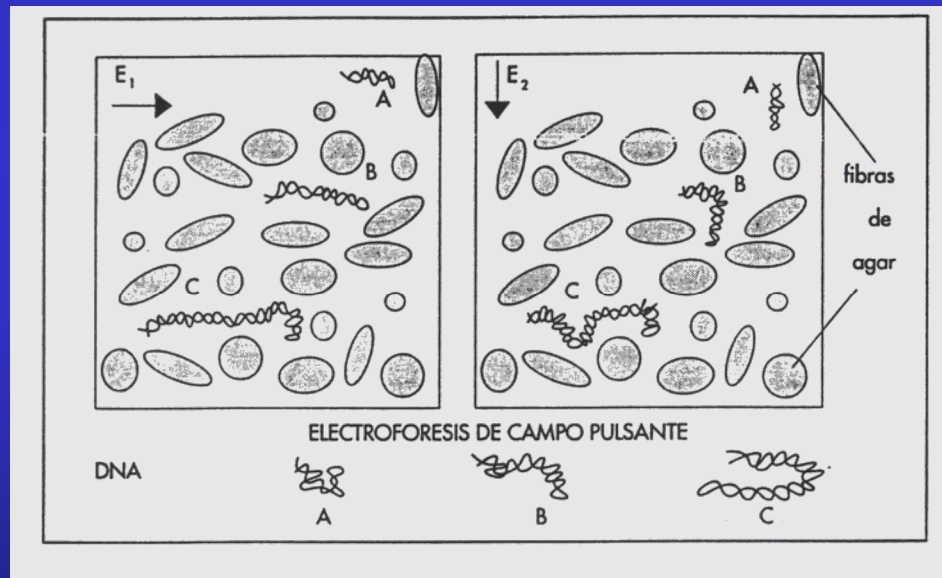
El color de cada banda corresponde al didesoxinucleótido 3'-terminal de ese fragmento.



ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

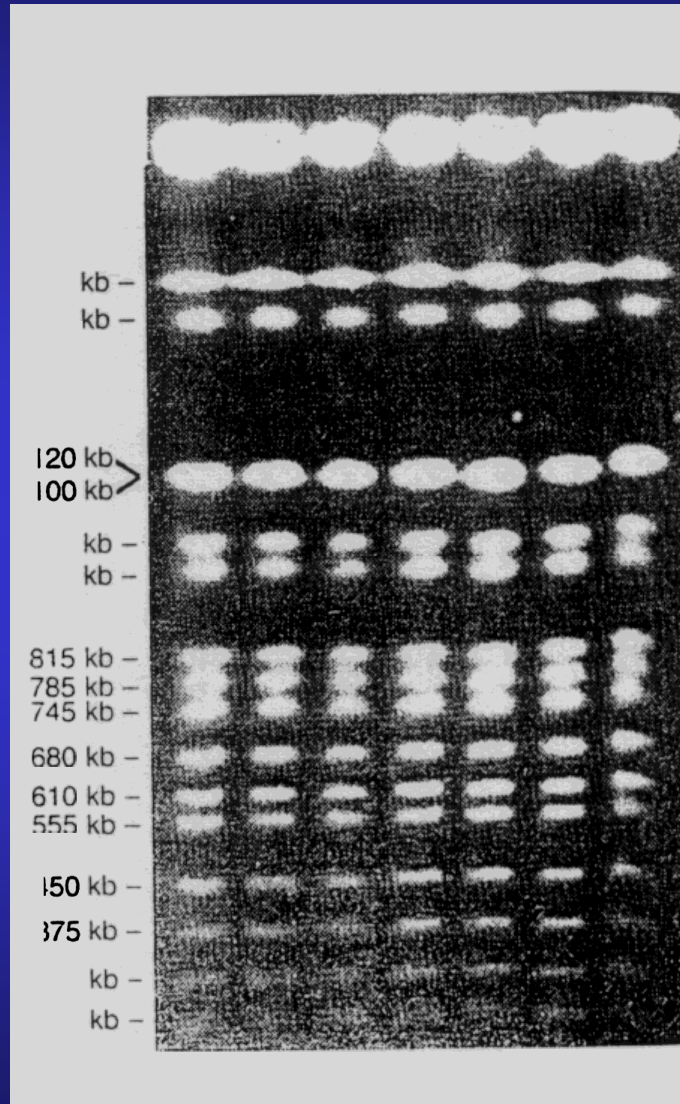
Campo
pulsante

- ADN gran tamaño (20-50 kb)
- Cromosomas

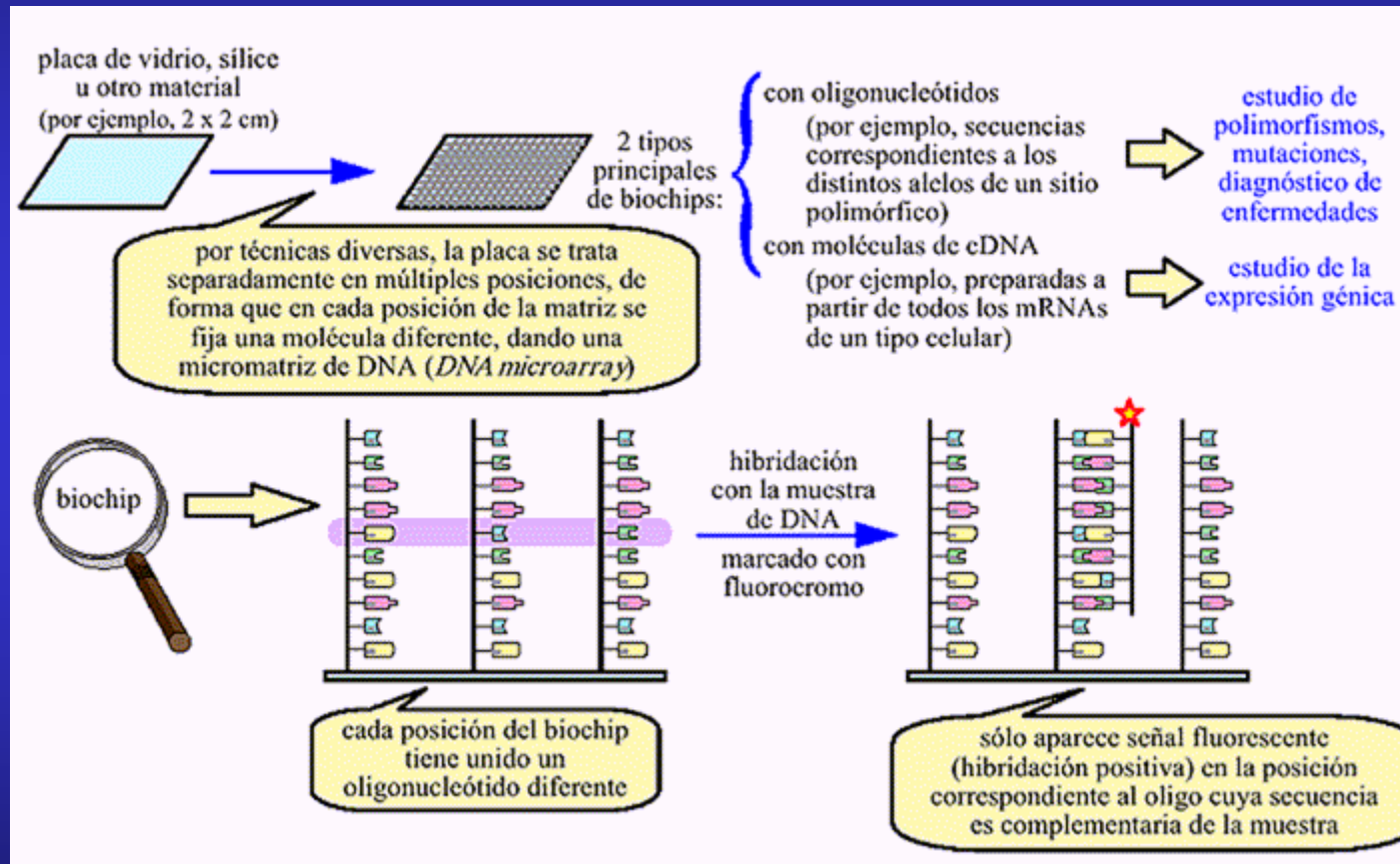


ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS

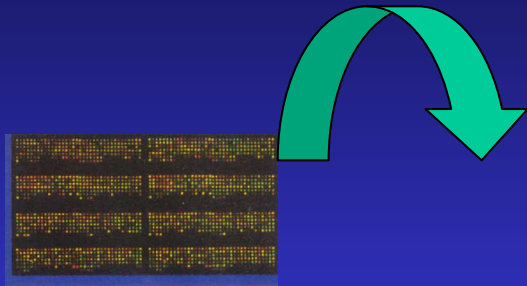
Campo
pulsante



-Micromatrices de ADN



ELECTROFORESIS ÁCIDOS NUCLEICOS



ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Generalidades

La electroforesis es el método más utilizado para analizar, separar, identificar y purificar ácidos nucleicos (ADN y ARN). Tiene aplicaciones muy variadas dependiendo de la matriz o soporte y de las condiciones:

<u>Matriz o soporte</u>	<u>Condiciones</u>	<u>Ejemplos de aplicaciones</u>
Agarosa	No desnaturalizante	Análisis de restricción Electroforesis bidimensional
	Desnaturalizante	Electroforesis alcalina Identificación de ARNs específicos (Northern blot)
Poliacrilamida	No desnaturalizante	Geles de retardo
	Desnaturalizante	Secuenciación Ensayo de protección de la ARNasa Técnica de la huella (Footprinting) Purificación de oligonucleótidos

Los ácidos nucleicos, a diferencia de las proteínas, tienen carga negativa debida a los grupos fosfato, cuando se encuentran en los tampones habituales pH 7.4-8 (Figura 1). Debido a esta propiedad siempre migran hacia el ánodo (+). La relación carga/tamaño es prácticamente la misma en todos los ácidos nucleicos, independientemente de su tamaño, por lo que 2 fragmentos muy diferentes en tamaño migrarían a la misma velocidad bajo un mismo campo eléctrico. Por lo tanto el elemento que va a limitar la movilidad de migración va a ser la matriz o soporte. En biología molecular suelen utilizarse 2 soportes principalmente: poliacrilamida y agarosa, bajo 2 condiciones: desnaturalizantes y no desnaturalizantes.

Por lo general, la migración se realizará en función de:

- Tamaño: en condiciones desnaturalizantes.
- Conformación-tamaño: en condiciones no desnaturalizantes.

La elección de la matriz va a depender del rango de pesos moleculares que queramos discriminar (Figura 2). Por lo general:

- Poliacrilamida: 5-500 pb
- Agarosa: 500 pb-20 kb
- Campo pulsante: más de 50 kb

Electroforesis en geles de agarosa en condiciones no desnaturalizantes

Suele utilizarse para analizar fragmentos de ADN y también para su purificación. Las agarosas se obtienen comercialmente y presentan varios grados de pureza. Las más puras suelen utilizarse para ARN, molécula más inestable que el ADN. Las impurezas presentes pueden afectar tratamientos posteriores que vayan a realizarse con los ácidos nucleicos y deben ser tenidas en cuenta. De esta forma, muchas técnicas requieren el procesamiento del ADN en el propio gel y la agarosa elegida debe ser compatible con dicho tratamiento.

La agarosa es un polisacárido que se obtiene del agar (agarosa + agaropectina) a partir de algas marinas por métodos industriales que no vienen a cuento. El polisacárido de la agarosa está formado por la repetición del disacárido agarobiosa unas 400 veces. La agarobiosa está formada por 1 molécula de β -D-galactopiranososa y otra de 3,6-anhidro- α -L-galactopiranososa unidas por un enlace 1-4. El carbono 2 de la 3,6-anhidro- α -L-galactopiranososa posee un grupo funcional (R), que le confiere diversas propiedades a la agarosa (utilización para electroforesis, clonado, cultivo, etc.). La gelificación (disolución en tampón a 100°C y enfriamiento) produce el reordenamiento de las cadenas lineales, establecimiento de puentes de hidrógeno y formación de dobles hélices entre los polímeros. El resultado es un gel con un reticulado característico, presentando poros intermedios donde se aloja el tampón y por los que migran las moléculas de ácidos nucleicos (Figura 3). Según el % de agarosa se producirá un reticulado más o menos denso, que opondrá mayor o menor resistencia a las moléculas en su migración.

Entre los tipos de agarosa se puede destacar la standard y la de bajo punto de fusión. La standard funde a 80-90°C y gelifica a 35°C-temperatura ambiente. Las de bajo punto de fusión (R: grupos hidroxietilo) funden a 65°C y gelifican a temperatura ambiente generalmente. Éstas últimas se utilizan para purificar fragmentos de ADN. Para ello, una vez realizada la migración en el gel, la banda se recorta de éste y en un tubo se calienta a 65°C. El ADN pasa a solución y se purifica por procedimientos convencionales. La purificación podría hacerse a partir de una agarosa standard, pero hay que señalar que ésta funde a 90°C, la misma temperatura de separación de las hebras de ADN, lo que dificulta su purificación.

Las muestras en los geles de agarosa suelen migrarse en cubetas horizontales, de tal forma que el gel está totalmente sumergido en el tampón de electroforesis (electroforesis submarina). El protocolo para la migración es el siguiente:

- Disolver la agarosa calentando a 100°C (microondas) en tampón de electroforesis. Mezclar bien.
- Una vez disuelta (solución transparente), esperar a que descienda la temperatura.
- Verter la agarosa todavía líquida en un molde (transparente a la radiación uv) cuyos extremos están cerrados con cinta adhesiva o con topes (Figura 4).
- Colocar el peine perpendicularmente al gel. Las púas de éste no deben tocar el fondo del molde ya que sino los pocillos perderían la muestra (Figura 4).
- Dejar gelificar a temperatura ambiente (40-60 min)
- Una vez gelificado quitar el peine y la cinta adhesiva, o los topes, para permitir el paso de la corriente durante la migración.
- Colocar el gel en la cubeta. Los pocillos deben estar próximos al cátodo (Figura 5).
- Añadir tampón de electroforesis de manera que el gel quede totalmente cubierto (Figuras 4 y 5). Esto ayuda a disipar el calor generado y crea un campo eléctrico uniforme.
- Cargar las muestras en los pocillos (Figura 5).
- Conectar la corriente: 1-10 volts/cm (los cm se refieren a la distancia entre los electrodos).
- Cuando los colorantes hayan migrado la distancia deseada, parar la corriente y teñir (5-20 min) el gel para visualizar el ADN con bromuro de etidio (1 µg/ml).
- La visualización se realiza con un transiluminador a 302 nm.
- Hacer una foto polaroid (instantánea) para analizar, o bien por videocámara transmitir a un ordenador y sacar una copia en papel (Figura 6).

- Notas:

- Dimensiones del gel: Grosor: 3-5 mm. Longitud: 10-20 cm.
- Composición del tampón de electroforersis: TE: 10 mM Tris pH 7.4-8, 1 mM EDTA (alternativo: 20 mM acetato sódico)
- Composición del tampón de muestra: Es el mismo tampón que el de electroforesis (TE), pero con una serie de aditivos para incrementar la densidad (30% glicerol o 15% Ficoll) y conseguir que la muestra se deposite en el fondo del pocillo, evitando que difunda y salga de éste. Además lleva una serie de colorantes que permiten seguir la migración: 0.4% naranja G (migra aproximadamente como un fragmento de 50 pb), 0.25% azul de bromofenol (migra aproximadamente como un fragmento de ADN de 300 pb) y 0.25%, xylene cianol (migra aproximadamente como un fragmento de ADN de 4 kb). Todos estos colorantes poseen carga negativa por lo que migran en la misma dirección que el ADN.
- Cantidad mínima de muestra: Depende del método de detección. El bromuro de etidio tiene un límite de detección de 5-10 ng/pocillo. Si el ADN está marcado radiactivamente (³²P, ³⁵S) se pueden detectar del orden de pg, aunque habría que hacer una autorradiografía. El volumen de muestra depende del volumen de los pocillos (nunca debe desbordar) pero oscila entre 10-50 µl.
- Marcadores de peso molecular: Para ayudar a estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se hace migrar en un pocillo adjunto una serie de patrones conteniendo fragmentos de ADN de un tamaño conocido. Suelen adquirirse comercialmente y entre ellos señalar: λ digerido con HindIII o ΦX174 digerido con HaeIII (Figura 7).
- Utilización del bromuro de etidio: El bromuro de etidio puede añadirse una vez disuelta la agarosa, y antes de verterla al molde, o bien directamente en el tampón de electroforesis. Esto evita la etapa de tinción al final. El bromuro de etidio es cancerígeno, por lo que es recomendable llevar guantes puestos y extremar las precauciones durante su manejo.

- Algunas consideraciones a tener en cuenta:

- El voltaje: la separación de los fragmentos de ADN es mejor si se realiza a bajos voltajes, aunque esto aumenta considerablemente el tiempo de migración. De todas formas, voltajes elevados son más utilizados para fragmentos pequeños, ya que al migrar más rápido se reduce su difusión. Atención, los voltajes elevados por encima de los rangos permitidos pueden recalentar el tampón de electroforesis y fundir la agarosa, lo que llevaría a la pérdida de la muestra.
- La velocidad de migración del ADN en un gel depende del tamaño del poro, de tal forma que concentraciones elevadas de agarosa, producen poros más pequeños y disminuyen la movilidad del ADN. Al igual que para las proteínas, la movilidad electroforética de un fragmento de ADN es inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño expresado en pares de bases (representación de Ferguson).
- Conformación del ADN y su relación con la migración: El ADN lineal en solución se comporta como una cadena flexible (conformación relajada). Su paso a través de los poros del gel dependerá del radio de giro, de forma que a más longitud, más dificultad en pasar a través de los poros del gel. Al aplicar un campo eléctrico los fragmentos de ADN se orientan en la dirección del campo, por lo que todos avanzan presentando la misma sección (18 Å). La progresión en el gel se realiza por un movimiento de reptación, de tal forma que los fragmentos mayores van más lentos, ya que rozan más con la matriz que los más cortos. En el ADN circular la movilidad electroforética aumenta con el grado de enrollamiento. Más enrollamiento implica ADN más compacto y por lo tanto mejor migración a través del gel (Figura 8).

- Aplicaciones: Análisis de restricción

- Las muestras de ADN digeridas por distintas enzimas de restricción pueden visualizarse en un gel de agarosa.
- La digestión produce fragmentos lineales que se cargan en el gel. En uno de los pocillos se cargan marcadores de pesos moleculares del rango esperado. Al final de la migración y por comparación con los marcadores se pueden determinar o verificar los sitios de restricción en un ADN. Ejemplo: Figura 9: 1) c-fos no digerido, 2) c-fos digerido con HindIII (3.3 kb), 3) c-fos no digerido, 4) c-fos digerido con EcoRI (2.4 kb + 0.9 kb), 5) fra-1 no digerido, 6) fra-1 digerido con EcoRI (2.9 kb + 1.5 kb), 7) MWM: λ /HindIII.

- Otras aplicaciones:

- La electroforesis bidimensional puede aplicarse para una doble digestión. Los fragmentos digeridos se separan en una primera dimensión y se someten en el gel a una segunda digestión para luego ser separados por electroforesis nuevamente. La agarosa tiene que ser compatible con el tratamiento.

Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes

Este tipo de electroforesis es el paso previo a la técnica de hibridación tipo Northern para análisis de ARNm. Esta técnica permite detectar el nivel de expresión de un determinado gen en un determinado tejido, evaluar su tamaño y tipo de maduración ("splicing" o entrecortado diferencial).

- Protocolo de montaje del gel y migración (idem que agarosa no desnaturalizante)

- Consideraciones a tener en cuenta para muestras de ARNm:

- Agente desnaturalizante: El ARNm al ser de cadena simple, tiene la tendencia a adoptar diversas conformaciones, por lo que su migración en condiciones desnaturalizantes asegura la fiabilidad en la separación por tamaños.
- Diversos agentes desnaturalizantes convierten las moléculas de ARN plegadas en lineales.
- Candidatos:
 - a) Las condiciones de la electroforesis alcalina (que se usan para analizar ADN de cadena simple) no pueden aplicarse, ya que hidrolizarían al ARN a pH tan básicos.
 - b) La urea y la formamida (que se utilizan en geles de poliacrilamida) disgregarían la agarosa, ya que romperían los puentes de hidrógeno que mantienen la estructura del polisacárido en estado de gel.

- c) Glioxal desionizado o etanedial ($O=CH=CH=O$). Este aldehído reacciona covalentemente con las G impidiendo su apareamiento (recordar que la interacción G-C es la más fuerte, ya que implica 3 puentes de H, comparada con la A-U). Para ello las muestras de ARN son tratadas con glioxal a alta temperatura ($50^{\circ}C/1h$) y cargadas en un gel de agarosa. El tampón donde se disuelve la agarosa y donde se sumerge el gel es tampón fosfato 10 mM. Durante la migración, que dura un par de horas para un recorrido de 8 cm, el cambio del pH por electrolisis del tampón puede evitarse poniendo una bomba peristáltica que lo recicle. Esto es importante, ya que el glioxal permanece unido al ARN a pH neutro.
- d) Formaldehído ($O=CH_2$): Este aldehído interacciona con los átomos de nitrógeno de las bases, impidiendo su apareamiento. Este compuesto debe estar presente además en la matriz de agarosa. El tampón utilizado en esta electroforesis es 20 mM MOPS (ácido 3[N-morfolino]propanosulfónico). El formaldehído es volátil y muy tóxico por lo que todas las manipulaciones deben hacerse bajo campana de gases, incluida la migración del gel.

- Aplicaciones: Análisis de ARNm (hibridación por Northern blot)

Una vez finalizada la migración el ARNm es transferido a una membrana de nylon por capilaridad, vacío o electrotransferencia. La capilaridad se utiliza para ARNs de tamaño intermedio (Figura 10), mientras que la electrotransferencia sería para ARNs de gran tamaño. La capilaridad es más lenta y se realiza durante 18 h, mientras que la electrotransferencia requiere tan sólo 2 h. ARNs de gran tamaño puede transferirse también por capilaridad, para ello el gel debe migrar el doble de longitud. La transferencia por vacío sirve para todos los tamaños de ARN y además dura tan sólo 2 h.

El siguiente paso es fijar el ARNm a la membrana. Esto puede realizarse calentando la membrana a $80^{\circ}C$ durante 2h o irradiándola con luz uv (312 nm) en receptáculos especiales. En este paso la membrana puede teñirse con azul de metileno para ver la integridad del ARN. Si se ha aislado ARN total se verán 2 grandes manchas correspondientes al ARN ribosomal 28S (5 kb) y 18S (2 kb). Si se ha aislado ARNm se verá una estela continua todo lo largo de la membrana. En caso de degradación del ARN (aislamiento realizado en condiciones precarias: presencia de ARNasas) se observa una estela cónica más ancha por su base, correspondiendo a los ARN degradados de pequeño tamaño. Finalmente la membrana se hibrida con una sonda complementaria, generalmente marcada radiactivamente (^{32}P) y el resultado se visualiza por autoradiografía (Figura 10).

Electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones no desnaturalizantes

- Generalidades:

La acrilamida se utiliza para analizar y separar pequeños fragmentos de ADN (< 500 pb). Generalmente se utilizan geles al 8% poli(acrilamida), con una relación acrilamida:bisacrilamida de 19:1. Un dato importante es que no suele utilizarse gel concentrante, a diferencia de los geles de proteínas. La migración se realiza también de acuerdo al tamaño, es decir, los fragmentos más ligeros migran más rápido. De todas formas, la composición de bases puede modificar los patrones de migración, por ejemplo fragmentos del mismo tamaño con repeticiones periódicas de A, presentan patrones de migración diferentes, aunque éstos son casos excepcionales. Se presentan en 3 tamaños: mini, midi y maxigeles.

- Montaje del gel (Figura 11):

- Montar los cristales y separadores de acuerdo con una construcción vertical especificada por el fabricante.
- Mezclar la acrilamida-bisacrilamida + TBE + TEMED + persulfato amónico.
- Verter la mezcla entre los 2 cristales evitando la formación de burbujas y que la acrilamida se salga de la construcción.
- Colocar el peine y dejar polimerizar 1-3h (dependiendo de la longitud del gel).
- Añadir el tampón de electroforesis (TBE), que está separado en 2 contenedores: uno superior y otro inferior.
- Precorrer 30 min en las mismas condiciones de la migración.
- Cargar las muestras en los pocillos correspondientes. Migrar: 1:30 h/60 volts (minigeles), 3h/120 volts (midigeles), 3-5h/65 watts (1500 volts) (maxigeles).

- Al final de la electroforesis procesar el gel: tinción con bromuro de etidio (ng) (Figura 12), tinción con nitrato de plata (pg), secar en un papel de filtro y proceder a autorradiografía (si el ADN está marcado radiactivamente), etc.

- Notas:

- Los espaciadores y peines suelen tener un grosor de 0.5 mm, aunque otros grosores alrededor de 0.75-1 mm se pueden utilizar también.
- Longitud del gel: 8 cm (minigeles), 15 cm (midigeles), 80-100 cm (maxigeles).
- Composición del tampón de electroforesis: TBE: 90 mM Tris pH 8.0, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA.
- Composición del tampón de muestra: Al igual que en la agarosa contiene los mismos componentes para incrementar la densidad y colorantes para seguir la migración.
- Volumen de muestra: 10-20 μ l.
- Cantidad de muestra: 0.1-2 μ g de ADN.
- Si se analizan tamaños, correr en un pocillo libre marcadores de pesos moleculares.
- La acrilamida en estado líquido es neurotóxica, es altamente recomendable llevar guantes.

Aplicaciones: Retardo de ADN en geles

Una utilidad de los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes son los geles de retardo. Estos geles permiten visualizar si determinadas proteínas (generalmente factores de transcripción) son capaces de interactuar con determinadas secuencias de ADN. La base de la técnica se basa en que la movilidad de los complejos ADN-proteína está más restringida que la del ADN libre. La interacción ADN-proteína requiere condiciones no desnaturizantes. El ADN cadena doble se marca radiactivamente en el extremo 3'-OH (por la kinasa T4 y 32 P- γ -ATP) o en 5'-P (por transferasa terminal y 32 P- α -ATP) y se incuba en presencia de un extracto de proteínas (factores de transcripción parcialmente purificados, extractos nucleares, etc.) para determinar si son capaces de reconocer dicha secuencia. El conjunto se carga en un gel de poliacrilamida no desnaturizante y se deja migrar. El ADN libre migra más rápido que el complejo ADN-proteína. Al finalizar la migración, el gel es secado en un papel de filtro y expuesto para autorradiografía (Figura 13).

Esta técnica requiere diversos controles:

- Competición de la unión con el mismo ADN pero no marcado radiactivamente: desaparece el retardo.
- Retardo con un ADN marcado de la misma longitud y diferente secuencia: no se produce retardo o un retardo diferente.
- Competición con ADN no marcado y de diferente secuencia: no afecta al retardo.

Para complementar los resultados se puede añadir un anticuerpo que reconozca la proteína que sospechamos. Si el epitopo de dicha proteína está accesible, se producirá un retardo mayor. También por mutagénesis dirigida se pueden alterar algunas de las bases del ADN, lo que permite determinar qué bases interactúan con la proteína en cuestión. En el caso de que la base sea esencial para la unión de la proteína, el retardo desaparece.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes permite la resolución base a base de moléculas de ADN. Se puede aplicar tanto a técnicas analíticas (secuenciación, ensayo de protección de la ARNasa o técnica de la huella), como preparativas (purificación de oligonucleótidos por electrofluencia). El agente desnaturizante presente en el gel suele ser urea o formamida, que evitan el apareamiento entre las bases complementarias al deshacer los puentes de hidrógeno entre ellas.

El montaje y las características de los geles con finalidad analítica son prácticamente las mismas que para los geles no desnaturizantes. Salvo algunas variaciones:

- La urea se ha de disolver con la mezcla de acrilamida calentando con agitación a 55°C aproximadamente.
- Las muestras han de calentarse a 90°C/ 3min para desnaturizarlas.

- El tampón de muestra puede contener algún agente desnaturante, generalmente formamida desionizada, además del tampón de electroforesis, los aumentadores de la densidad y colorantes.

Estos geles pueden tener también finalidad preparativa: Los oligonucleótidos, utilizados en reacciones de secuenciación o PCR, pueden purificarse a partir de geles de poliacrilamida desnaturantes. La composición y el protocolo para preparar los geles es el mismo que se ha descrito. Ahora bien, la electroforesis puede realizarse a mayor voltaje, que además de acortar el proceso, aumenta la resolución de las bandas. La temperatura para una buena resolución debe oscilar entre 50-70°C. Las bandas correspondientes a los nucleótidos deseados son cortadas del gel y purificadas por electrolucción por métodos clásicos. Generalmente, el fragmento de gel se coloca en una bolsa para diálisis bien cerrada con tampón de electroforesis. Se aplica un campo eléctrico para hacer salir al oligonucleótido del gel durante un tiempo (el proceso puede visualizarse por uv). Finalmente el campo eléctrico se invierte para despegar al ADN de la bolsa de diálisis. El oligonucleótido liberado que está en solución en el tampón, es purificado por métodos tradicionales. Existen aparatos comerciales para electrolucción que contienen un pequeño receptáculo donde se aloja el trozo de gel. Al aplicar el campo eléctrico el ADN es obligado a pasar a través de un orificio donde se encuentra un compuesto que lo hace precipitar. El ADN así obtenido se purifica por métodos convencionales.

- Aplicaciones: Secuenciación de ADN

El método que se utiliza es el de la terminación enzimática de Sanger. Este método se basa en el uso de dideoxinucleótidos que abortan el crecimiento de una cadena que está siendo sintetizada por una ADN-polimerasa. La causa es que los dideoxinucleótidos no pueden formar un enlace fosfodiéster para incorporar la siguiente base. Para ello es necesario un cebador (“primer”) marcado radiactivamente para la polimerasa, y se realizan 4 reacciones en las que un dideoxinucleótido está presente (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP). Si la relación del dideoxinucleótido con el deoxinucleótido es la correcta, la síntesis de la cadena se detiene en todos los deoxinucleótidos presentes, obteniéndose una serie de fragmentos de diferente tamaño (Figura 14).

Los fragmentos se separan en un maxigel en condiciones desnaturantes en presencia de urea. Los maxigeles tienen un grosor de 0.4 mm y la migración se realiza a una elevada temperatura (50°C). La distribución uniforme de la temperatura por todo el gel se consigue utilizando placas disipadoras. Las muestras (alrededor de 3 µl) se cargan con peines en forma de dientes de tiburón (Figura 15). La migración se realiza siempre a potencia constante y a alto voltaje: 1.500 volts.

La longitud del gel permite resolver del orden de 100 nucleótidos por carril, evitando así las compresiones que se suelen dar en geles más pequeños. El ADN a secuenciar puede estar marcado radiactivamente, por lo que su detección se realizará por autorradiografía, una vez el gel haya sido secado a un papel de filtro. Los fragmentos son separados según su talla, de tal forma que los más ligeros corresponden a las bases más cercanas a la marca radiactiva. La secuencia obtenida leída de arriba hacia abajo corresponde a la secuencia de la hebra complementaria, que es justamente la hebra sintetizada a partir del cebador (Figura 16). La reacción también puede hacerse utilizando un cebador marcado con un compuesto fluorescente (por ejemplo fluoresceína, rodamina, etc.), con lo que la detección puede hacerse por fluorescencia y de forma automática (Figura 17). Para ello un laser excita cada banda que emite una señal luminosa, que es registrada en un ordenador que determina la secuencia correspondiente.

Otras técnicas electroforéticas

- **Electroforesis en campo pulsante:**

Permite separar fragmentos de ADN de más de 20 kb, que no son separables por los métodos convencionales. Los tamaños que se pueden separar van desde 50 kb a varios cientos de kb. La técnica fue aplicada con éxito por primera vez para separar cromosomas de levadura.

La base de la técnica consiste en que si ADNs de distinto tamaño son cargados en un gel de agarosa de bajo porcentaje. Cuando son sometidas a un campo eléctrico (E1) en una determinada dirección, éstos se orientan con respecto E1. Si seguidamente se aplica otro campo con orientación diferente E2, se obliga a los fragmentos a reorientarse. Los fragmentos más pequeños se reorientan más fácilmente, ya que tienen menos impedimentos, mientras que los más grandes migran más lentamente, ya

que su reorientación entre los poros de agarosa resulta más complicada. Una de las formas de crear un campo pulsante son las construcciones ortogonales, aunque existen muchas otras posibilidades (Figura 18).

- Electroforesis capilar:

Se trata de la aplicación más novedosa para la secuenciación de ácidos nucleicos. Los fragmentos de ADN marcados fluorescentemente son cargados en un mismo capilar que contiene un polímero pre-formulado comercialmente. Se usan diferentes de estos polímeros, denominados POPTM (Performance Optimized Polymers de Perkin Elmer), en función del tamaño del ADN que se está secuenciando. Los oligonucleótidos fluorescentes migran y en un punto terminal del capilar son excitados con un laser y la señal emitida es captada y analizada de forma automática. Este sistema permite la lectura de muchas más bases que por los métodos convencionales en geles de poliacrilamida.

Biochips

Los formatos clásicos de las técnicas electroforéticas podrán ser sustituidos o complementados en un futuro no muy lejano por el formato del biochip (“microarray”). Básicamente, los biochips son sistemas que se caracterizan por una alta densidad de integración de material biológico. Para ello se utilizan las tecnologías de la ultraminiaturización combinadas con el poder de la Informática (tratamiento de imágenes, bases de datos e interpretación y procesado de la información).

El proyecto Genoma Humano que se prevee estará finalizado para el siglo XXI, proporcionará la secuencia de los 3.000 millones de bases. Sin embargo esta información será insuficiente para entender el funcionamiento de los productos de los 80.000 genes que comprenden el patrimonio genético del ser humano. Por esta razón, proyectos paralelos como Proteoma o Fisioma están comenzando a emerger. Para ello será necesario monitorizar elevados volúmenes de información en paralelo a través de biochips y de lab-chips. Estos sistemas permiten obtener un enorme volumen de información en tiempos muy breves, que llevarían años mediante las técnicas electroforéticas clásicas. Un diseño clásico de un protocolo basado en biochips se esquematiza en la Figura 19.

La tecnología básica en la cual se basan los biochips consiste en una matriz de diferentes ADNs adherida por diversos procedimientos a un chip de material sólido. El material complementario de alguno(s) de estos ADNs se deposita en cantidades microscópicas sobre la citada matriz y se incuba para favorecer la hibridación. Finalmente, el ADN que no ha hibridado es eluido y el ADN complementario (marcado fluorescentemente) a alguno de los componentes del biochip es detectado por técnicas fluorescentes convencionales. La señal obtenida es analizada e identificada en bases de datos por poderosos métodos informáticos.

Los biochips consisten en unas pequeñas casillas que actúan a modo de tubo de ensayo permitiendo análisis de forma independiente. El diseño de estas matrices permite la integración en un mismo biochip de 100-1000 secuencias conocidas de ADN. El material del que están contruidos es vidrio, plástico o micromembranas de nylon.

La más importante aplicación sería dentro del campo del diagnóstico molecular para la detección de mutaciones. Para ello, en el biochip se incluyen una serie de oligonucleótidos que corresponderían a una sección específica de un gen de estudio, abarcando todas las posibles mutaciones. El/los fragmento(s) que hibride(n) con ADN extraído de un sujeto, permanecerá unido en un lugar del biochip tras los lavados y permitirá averiguar en un simple ensayo qué tipo de mutación tiene el citado sujeto a partir de una muestra de ADN ridícula.

Bibliografía

- García-Segura JM, Gavilanes JG, Martínez del Pozo A, Montero F, Oñaderra M, Vivanco F. Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica. Ed Síntesis, Ciencias Químicas (1996).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ª ed. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. 2ª ed. Ed Freeman and Company (1992).
- Wong DWS. The ABCs of gene cloning. Ed Chapman & Hall (1997).