

17.- Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico

Carmen Alicia Padilla Peña, Jesús Diez Dapena, Emilia Martínez Galisteo, José Antonio Bárcena Ruiz, Concepción García Alfonso

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

RESUMEN

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA en estudio. En esta práctica, se pretende que el alumno comprenda el fundamento teórico de esta técnica y sus aplicaciones, llevando a cabo la separación electroforética en gel de agarosa de DNA plasmídico que el mismo alumno va a aislar y purificar a partir de un cultivo bacteriano. Se han desarrollado un gran número de métodos para la purificación de DNA plasmídico de bacterias y todos ellos implican invariablemente tres pasos: crecimiento de la estirpe bacteriana portadora, recogida y lisis de las bacterias y purificación del DNA plasmídico. A continuación, el DNA aislado se puede analizar mediante electroforesis en gel de agarosa.

Palabras clave: ácidos nucleicos, electroforesis, gel de agarosa, marcadores de peso molecular, plásmidos.

Abreviaturas empleadas. DNA: ácido desoxirribonucleico; LB: Luria-Bertani; SDS: dodecil sulfato sódico; TBE: Tris-borato-EDTA (etilen-diamino tetraacético); UV: luz ultravioleta.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos...) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos. Existen muchos tipos de electroforesis, que se engloban en dos categorías fundamentales:

- Electroforesis de frente móvil.
- Electroforesis de zona.

Actualmente, sólo se utiliza la electroforesis de zona, en la cual la muestra se desplaza sobre un soporte sólido, como papel de filtro, celulosa o gel (agarosa, acrilamida...) y los componentes de la muestra migran en forma de pequeñas bandas, también llamadas zonas.

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema.

En el caso de los geles de agarosa, se le añade **bromuro de etidio**, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular.

El DNA problema que se va a analizar mediante electroforesis en gel de agarosa en esta práctica es DNA plasmídico. Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circular y de pequeño tamaño (entre dos y varios cientos de kilobases) que se encuentran en muchas especies bacterianas. Se caracterizan porque se replican de manera independiente del DNA cromosómico bacteriano, tienen su propio origen de replicación, y no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyan a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos. Una determinada célula bacteriana puede no tener ningún plásmido o puede albergar un número variable de los mismos. Algunas clases de plásmidos poseen la propiedad conocida como "replicación relajada", esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación.

Se han desarrollado un gran número de métodos para la purificación de DNA plasmídico de bacterias y todos ellos implican invariablemente tres pasos:

- a) Crecimiento de la estirpe bacteriana portadora en medio de cultivo
- b) Recogida y lisis de las bacterias
- c) Purificación del DNA plasmídico

El método utilizado para la obtención de plásmido en esta práctica se denomina lisis alcalina y se basa en la desnaturalización selectiva del DNA cromosómico mediante alcalinización con NaOH y adición de SDS

(detergente), en condiciones en las que el DNA plasmídico permanece próximo a su estructura nativa, debido principalmente a su pequeño tamaño y su naturaleza circular y superenrollada. Al neutralizar el medio y añadir una alta concentración de sal (acetato potásico), se produce la precipitación de gran parte de las proteínas debido al tratamiento con SDS y a la alta concentración de sales. También precipita el DNA cromosómico, probablemente porque se producen reasociaciones al azar entre las diferentes regiones de este DNA y así se forman agregados insolubles. Por el contrario, no precipita el DNA plasmídico, que queda en el sobrenadante. Este DNA puede ser analizado y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa. En cada una de las calles del gel donde se cargue el DNA plasmídico, veremos tres bandas de distinto tamaño que corresponderán a las tres formas principales con las que migra el mismo en función de su grado de enrollamiento. Son las formas circular, enrollada y superenrollada que migran con menor a mayor velocidad, respectivamente, en una electroforesis.

Por último, prepararemos una recta de calibrado con los pesos moleculares de los marcadores (fragmentos del fago λ digerido con *Hind* III) en función de la distancia recorrida en la electroforesis e interpolaremos las distancias recorridas por los distintos estados de enrollamiento del plásmido para conocer su tamaño molecular.

Los objetivos fundamentales de esta práctica son dos:

- Familiarizarse con métodos de separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa.
- Aislamiento y purificación de plásmidos bacterianos a partir de estirpes portadoras mediante la utilización de un "Kit" comercial.
- Determinación de los tamaños moleculares mediante electroforesis en gel de agarosa, haciendo una recta patrón con fragmentos de DNA de peso molecular conocido.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

2.1. Equipamiento

Centrifuga eppendorf de sobremesa.
Microondas o placa calefactora.
Equipo de electroforesis (cubeta, soporte, peine, fuente de alimentación).
Transiluminador de luz UV.
Equipo de tratamiento de imagen y fotografía térmica.

2.2. Material

Matraces pequeños.
Pipetas de vidrio de 5 mL.
Probetas.
Micropipetas automáticas y puntas desechables para las mismas.
Tubos eppendorf de 1,5 mL.

2.3. Reactivos

Medio de cultivo LB.
Cultivo bacteriano portador del plásmido.
Solución de resuspensión de células.
Solución de lisis de células (NaOH/SDS).
Solución de neutralización.
Columnas pequeñas y solución "Quantum Prep".
Solución de lavado.
Agua estéril.
Tampón de electroforesis TBE (Tris-borato).
Agarosa.
Bromuro de etidio (¡¡¡¡MUY PELIGROSO, USAD GUANTES!!!!).
Tampón de carga de las muestras.
Marcadores de peso molecular.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

3.1. Preparación del cultivo bacteriano portador del plásmido

3.1.1. Se preparan matraces de cultivo o tubos con 5 mL (Luria-Bertani), a los que se añaden, en el momento de cultivar, el antibiótico apropiado.

3.1.2. Se toma una colonia bacteriana individual de una placa de medio de cultivo sólido, pasándola al medio líquido, y se incuba una noche a 37 °C con agitación.

NOTA: Cada grupo preparará el cultivo para los alumnos del día siguiente y utilizará para su práctica un cultivo ya preparado el día anterior. **¡Este apartado del protocolo se realizará mientras se lleva a cabo la electroforesis en gel de agarosa!**

3.2. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

3.2.1. Se cogen 1,5 ml del cultivo de bacterias y se ponen en un eppendorf, centrifugándose a continuación durante 1 minuto a 14000 rpm. Se retira el sobrenadante, dejando el sedimento lo más seco posible.

3.2.2. Se resuspende el sedimento de bacterias en 200 µl de **solución de resuspensión de células**, empleando la pipeta (se aspira y expulsa el líquido varias veces hasta que el sedimento se resuspenda).

3.2.3. Se añaden al mismo tubo 250 µl de **solución de lisis** (NaOH/SDS). Se mezcla el contenido del tubo por inversión suave unas 10 veces. La solución aparecerá viscosa y ligeramente clara si ha ocurrido la lisis celular.

3.2.4. A continuación, se añaden 250 µl de **solución de neutralización** (acetato potásico). Se mezcla el contenido del tubo por inversión suave unas 10 veces. Aparecerá un visible precipitado blanco que contiene el DNA cromosómico junto con las proteínas.

3.2.5. Se centrifuga 5 min a 14000 rpm y se prepara la columna, colocándola en un tubo.

3.2.6. Se transfiere el sobrenadante a la columna con la micropipeta, evitando tocar el sedimento. En este sobrenadante se encuentra el DNA del plásmido.

3.2.7. Se añaden a cada columna 200 µl de **solución “Quantum Prep”**. Se mezcla bien usando la pipeta.

3.2.8. Se centrifuga durante 30 segundos a 14000 rpm.

3.2.9. Se elimina el filtrado, volcando el tubo y se coloca de nuevo la columna en el tubo.

3.2.10. Se añaden 500 µl de **solución de lavado** a la columna y se centrifuga 30 segundos a 14000 rpm.

3.2.11. Se elimina el filtrado y se repite el paso anterior.

3.2.12. Se cambia la columna a un tubo eppendorf limpio y se añaden 100 µl de **solución de elución** (H₂O).

3.2.13. Se centrifuga 1 minuto a 14000 rpm y la solución recogida es la preparación de DNA plasmídico aislado y purificado.

3.3. Preparación del gel de agarosa

3.3.1. Se vierten en un matraz 30 ml del tampón de electroforesis TBE y 0,21 g de agarosa (0,7 %).

3.3.2. Se funde la solución de agarosa en un microondas o placa calefactora.

3.3.3. Se deja enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50°C aproximadamente.

3.3.4. Se sella con cinta adhesiva el soporte donde se va a verter el gel de agarosa y se coloca el peine que servirá para formar los pocillos del gel.

3.3.5. Una vez que la solución de agarosa ha alcanzado los 50°C, se le añaden 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se mezcla bien. **¡¡¡PONEROS GUANTES!!!**

3.3.6. Se vierte la solución de agarosa con bromuro de etidio en el soporte, previamente sellado. Se deja polimerizar durante unos 30 minutos.

3.4. Preparación de las muestras de DNA

3.4.1. Se cogen 20 µl del DNA plasmídico aislado en la 1ª parte de la práctica y se le añaden 5 µl de tampón de carga.

3.5. Electroforesis

3.5.1. Se quita la cinta adhesiva con la que se ha sellado el soporte del gel y se coloca en la cubeta de electroforesis. ¡¡OJO!!: Los pocillos deben de estar cerca del cátodo (polo negativo, color negro).

3.5.2. Se añade tampón de electroforesis TBE, de forma que cubra bien el gel de agarosa.

3.5.3. Se aplican 10 µl de la muestra preparada en el apartado anterior en dos de los pocillos.

3.5.4. Se aplican 10 µl de marcadores de peso molecular en dos de los pocillos.

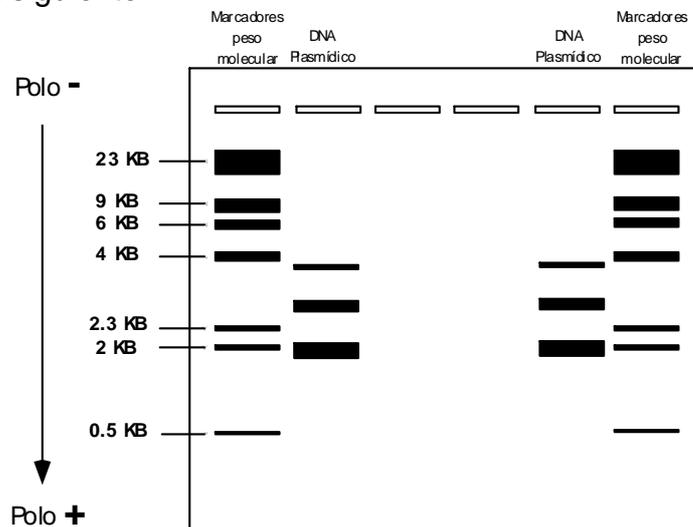
3.5.5. Se tapa la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación. Se comprueba que está bien conectada.

3.5.6. Se programa la fuente a unos 100 voltios y se comienza a correr la electroforesis que durará unos 30-45 minutos.

3.5.7. Una vez acabada la electroforesis se visualizan los fragmentos de DNA mediante luz UV y se realiza una fotografía de la imagen.

4. RESULTADOS ESPERADOS

La imagen obtenida del gel mediante la visualización con luz UV debe ser parecida a la siguiente:

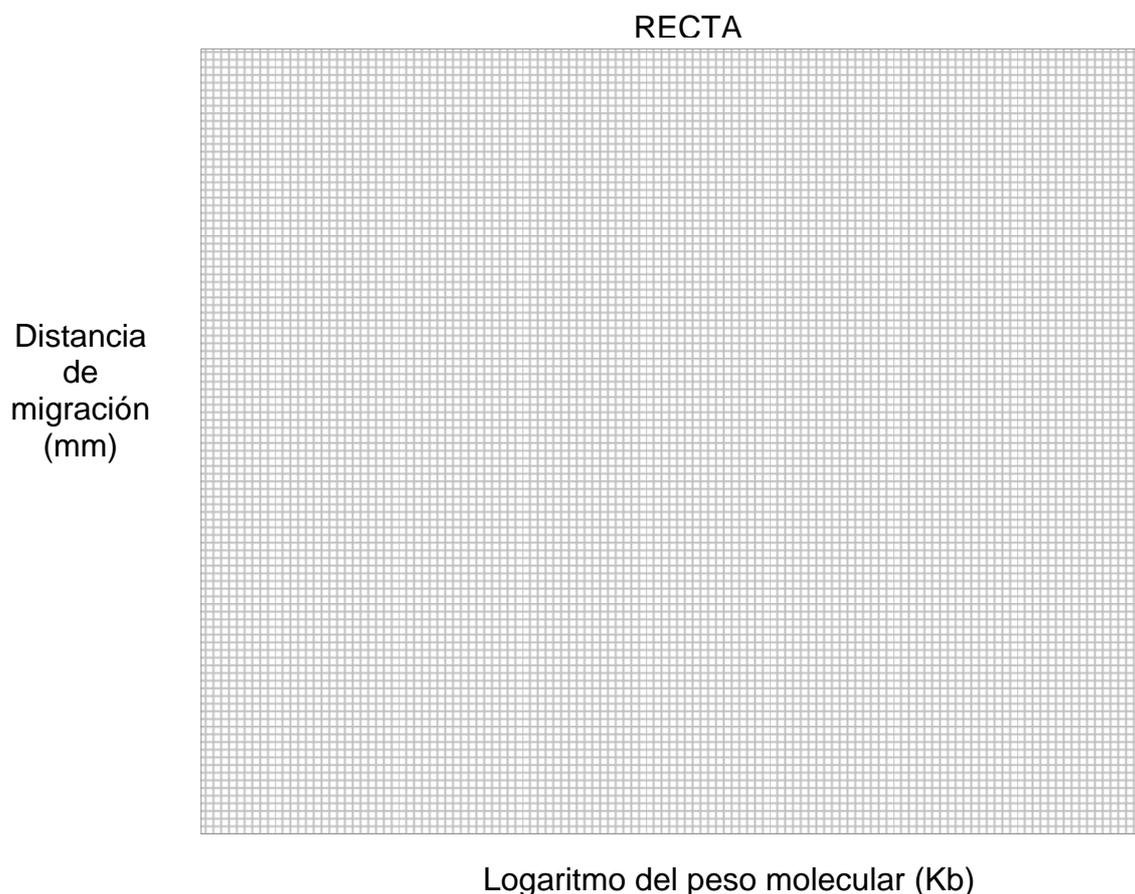


5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Una vez terminada la parte práctica, y haciendo uso de la imagen obtenida del gel de electroforesis, el alumno tendrá que discutir los resultados obtenidos y hacer los comentarios convenientes. Para ello, debe prestar atención a las calles del gel donde ha aplicado las muestras de DNA plasmídico. En ellas deben verse tres bandas de diferente intensidad y tamaño, que corresponden a las tres formas principales de enrollamiento del DNA plasmídico.

El alumno de forma individual deberá calcular el tamaño, expresado en pares de bases, de cada una de estas tres bandas, haciendo uso de una recta patrón que tendrá que construir con los marcadores de peso molecular utilizados en la electroforesis.

Se le entregará a cada alumno un folio con la imagen siguiente para hacer la recta patrón y calcular los tamaños de las distintas formas de DNA plasmídico. Además, se incluirá una serie de preguntas para comprobar que el alumno ha comprendido la práctica.



6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

Bio-Rad: Protocolo que acompaña al "Quantum Prep Miniprep Kit".

Nelson DL, Cox MM (2001): "Principios de Bioquímica", 3ª ed. Editorial Omega (Barcelona, España), pp 1119-1128.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003): "Bioquímica", 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp 152-154.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Medio de cultivo LB

Medio de cultivo LB		
	Medio líquido (g)	Medio sólido (g)
"Bacto tryptone"	10	10
"Bacto yeast extract"	5	5
ClNa	10	10
Agar	-	15
Agua destilada	Hasta 1 litros	Hasta 1 litro

Tampón de electroforesis TBE

Solución tampón 1X TBE		
	5,0 litros (g)	1 litro (g)
"Tris base"	55,8	11,16
Ácido bórico	42,1	8,42
EDTA-Na ₂	4,9	0,98
Agua destilada	Hasta 5 litros	Hasta 1 litro