

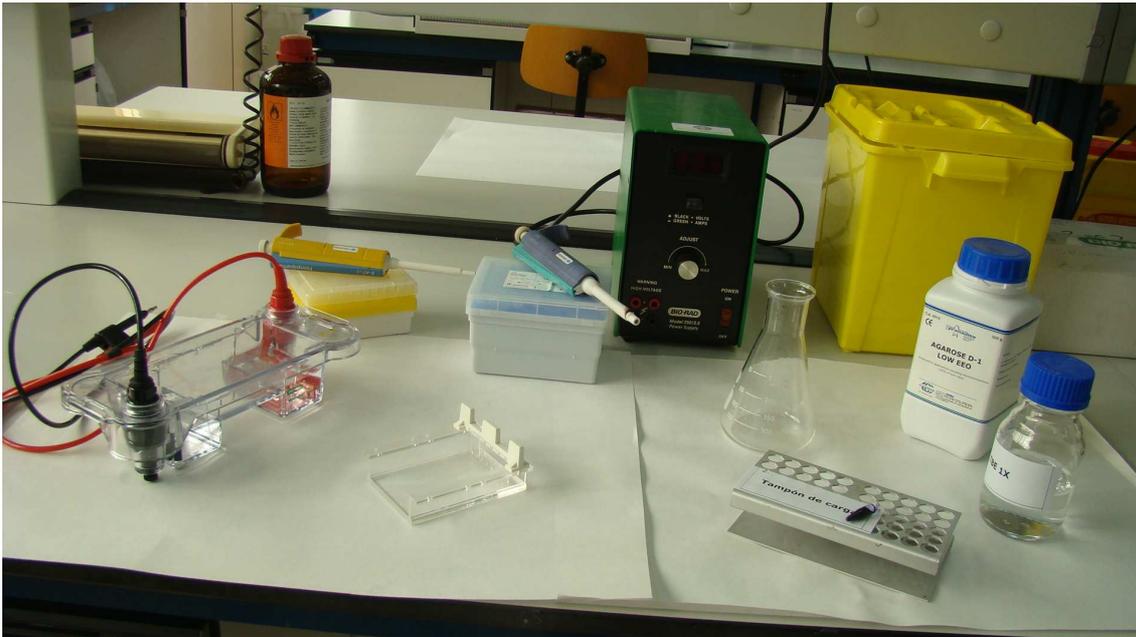
## **2. VISUALIZACIÓN DEL ADN BACTERIANO MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.**

### **Materiales**

- Bandeja para la preparación del gel
- Matraces
- Pipetas
- Puntas de pipeta estériles
- Agarosa
- Placa calefactora/horno microondas
- Cubeta y fuente para realizar la electroforesis
- Transiluminador ultravioleta
- Sistema de captación de imagen

### **Soluciones**

- TBE 1X: Tris 0,9 M, ácido bórico 0,9 M, EDTA 20 mM (pH=8,0). Se prepara una solución stock a una concentración 10 X y se diluye en el momento de su utilización.
- Tampón de carga: 0.25 % de azul de bromofenol, 10% glicerol y 40% de sacarosa en TBE 1X. Se disuelven todos los componentes y se almacena a 4 °C protegiéndolo de la luz.
- Solución para visualizar el DNA: Gel Red, Bromuro de Ethidio
- Marcador de peso molecular: dependiendo del DNA que se quiera analizar se pueden utilizar marcadores comerciales (100 bp *ladder*) o muestras de plásmidos de pesos conocidos extraídos de cepas control.



## Protocolo

1. Preparar un gel de agarosa a una concentración determinada (de 0.7 a 1.5% p/v) que varía en función del tamaño del ADN que se quiera visualizar.

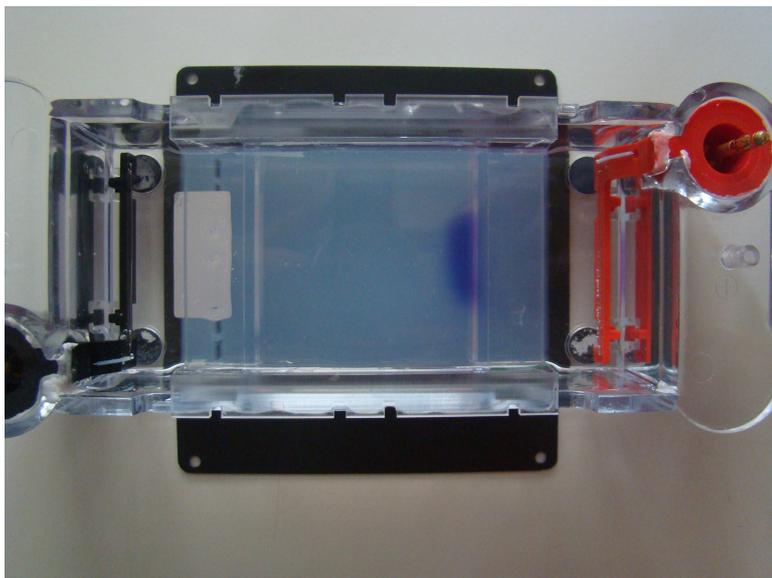
En general se preparan geles a una concentración de agarosa del 1 %, pero en los casos en los que se quieren separar fragmentos de ADN de mayor tamaño, como por ejemplo en aislamientos de plásmidos, se emplea una concentración de 0,7 % . La solución de Gel Red se puede añadir en este momento o a cada una de las muestras por separado (en este caso hay que tener en cuenta que puede afectar a la migración del DNA)

- Pesar la cantidad necesaria de agarosa
  - Disolver en un volumen correspondiente de TBE 1X. Calentar hasta ebullición, para conseguir la completa disolución de la agarosa
  - Verter en la cubeta de electroforesis que previamente se ha sellado, y en la que se ha colocado el peine que dará lugar a los pocillos.
  - Dejar enfriar hasta su completa solidificación
  - Una vez solidificado, retirar el peine y el sellado
2. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis, que previamente se ha llenado con tampón TBE 1X, de manera que el tampón cubra completamente el gel

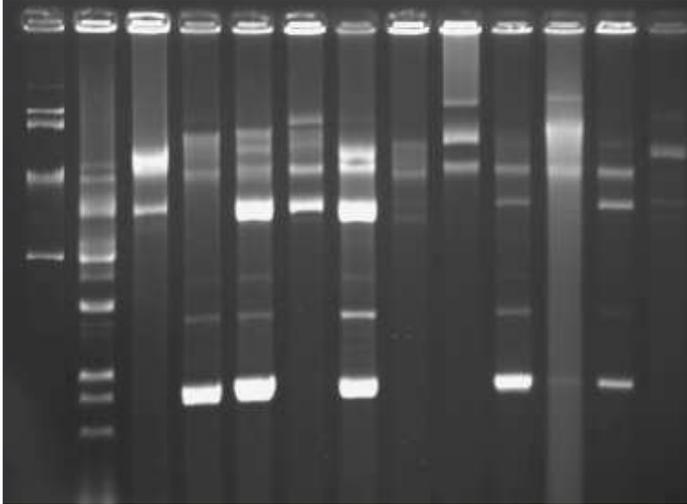
3. Cargar el gel: Para ello, hay que añadir 1  $\mu\text{l}$  de tampón de carga por cada 10  $\mu\text{l}$  ADN, de manera que la muestra pese suficiente para que caiga el interior del pocillo y no flote en el tampón TBE. También permite observar la migración del ADN en el gel de agarosa.



4. Colocar la tapa a la cubeta y seleccionar la intensidad de la corriente eléctrica (habitualmente entre 75 y 100 V).
5. Una vez que se observa que el ADN ha migrado hasta un poco antes de alcanzar el final de la cubeta, detener la corriente y sacar la base con el gel.



6. Separar el gel de agarosa de la base y visualizar en un transiluminador ultravioleta como se muestra en la siguiente imagen .



En la actualidad se utilizan sistemas computerizados de análisis de imagen como el que se muestra a continuación:

