

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Agustín Garrido

agugarrido@hotmail.com

Introducción

En este trabajo práctico se utilizó la técnica de electroforesis. Este proceso se basa en la migración de las moléculas con carga neta de una muestra, cuando es sometida a un campo eléctrico, hacia el polo opuesto de su carga. El método no es tan sencillo: primero hay que saber con qué tipo de moléculas estamos trabajando y de acuerdo a esto se elige el procedimiento y los materiales necesarios.

Hay dos fuerzas que determinan la velocidad con que una molécula migrará: la fuerza eléctrica y la de rozamiento. La primera es la responsable de que la molécula en cuestión sea atraída hacia uno de los electrodos. Por esto es que cuanto mayor sea el cociente carga/masa de la molécula mayor será la aceleración con que se mueva. La fuerza de rozamiento tiene una acción opuesta: a mayor rozamiento, menor velocidad de migración. Esta fuerza tiene que ver con el tamaño y forma de la molécula que migra, y con las características del medio en que se mueve.

En este trabajo práctico realizaremos electroforesis para separar moléculas de DNA doble cadena. La carga neta de estas moléculas está dada por los grupos fosfatos: como hay un fosfato cargado negativamente por cada nucleótido y la masa de los cuatro desoxirribonucleótidos es similar, podemos afirmar que el cociente carga/masa será independiente de la secuencia y la longitud de la doble cadena de DNA (todas las moléculas de DNA migrarán entonces hacia el ánodo). Esto quiere decir que no nos tendremos que preocupar por la fuerza eléctrica, ya que las diferencias en la migración estarán dadas exclusivamente por la fuerza de rozamiento. Como las moléculas migran en el mismo medio y todas tienen la misma forma, la velocidad de migración tendrá que ver únicamente con el tamaño de las moléculas (la longitud de la doble cadena, medida en pares de bases). Claro que cuando se corren plásmidos, por ejemplo, no podemos afirmar lo mismo: al tener distintas formas no ocurrirá lo explicado anteriormente. Lo mismo pasaría con RNA o DNA simple cadena que formen apareamientos internos: en esos casos hay que desnaturalizar antes de correr, de modo que resulten cadenas lineales.

Para realizar la electroforesis se utiliza un medio de migración adecuado, de modo que la separación sea eficiente, ya que se necesita que exista una suficiente fuerza de rozamiento para

que las moléculas de distinto tamaño se separen. Para ello se utiliza un gel que consiste en una red compuesta por un polímero orgánico (en este caso usamos agarosa, derivado de un polisacárido de un alga) y que aumenta considerablemente la fricción, impidiendo a la vez la difusión de las moléculas a través del medio acuoso en todas las direcciones. Al colocar las muestras de DNA a través de este gel y someterlo a un campo eléctrico durante cierto tiempo, podemos verlas separadas según su tamaño. La rapidez con que migren las moléculas puede ser regulada por la concentración de agarosa disuelta en buffer que usemos: a mayor concentración, mayor compactación de la red y por tanto menor velocidad de migración. La concentración que elijamos dependerá de lo que se quiera separar en cada corrida.

Para la corrida de proteínas, el proceso es diferente. Se suele utilizar una solución de poliacrilamida como gel y además las proteínas deben ser tratadas con SDS (detergente), que permite mantener constante el cociente carga/masa ya que las cargas netas de las proteínas nativas sí dependen de su secuencia. El SDS desnaturaliza y recubre los polipéptidos, aportando carga negativa de forma proporcional al tamaño de éstos. De esta manera, las proteínas tratadas con SDS migran hacia el ánodo, al igual que los ácidos nucleicos.

Una vez separados los DNAs de distintos tamaños, es posible conocer el peso de cada uno ya que el logaritmo del peso molecular es inversamente proporcional a la distancia recorrida desde el lugar de siembra. Es por eso que en cada corrida se hace necesario correr además de las muestras una mezcla de DNAs de pesos conocidos para trazar un gráfico de proporcionalidad. Estas mezclas se consiguen comercialmente y son conocidas como *markers*.

Metodología:

Preparación del gel:

El gel de agarosa fue preparado por los docentes de la siguiente forma:

Se realizó una solución de agarosa 0,8% p/v en tubo erlenmeyer, disolviéndola en buffer TAE 1x (1gr de agarosa + 125 ml de buffer). El buffer garantiza que durante la corrida el pH se mantenga cercano a 8. Esto es importante ya que la migración del DNA depende de las cargas negativas de los fosfatos, y las cargas dependen del pH del medio (es decir, de los iones cargados del medio). Si el pH del medio fuera muy ácido, posiblemente los fosfatos no se encontrarían ionizados y se afectaría la fuerza eléctrica que posibilita la migración de las moléculas. El buffer TAE 1x se obtiene de una solución stock TAE 50x, que se preparó con 242 g de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M y H₂O hasta llegar a 1 litro. Para disolver esta solución de agarosa en buffer se necesitó calentar en un horno microondas (para fundir). Luego se

agregó el bromuro de etidio, que al intercalarse en el DNA (se mete entre los nucleótidos apilados), distorsiona la doble hélice y nos permite visualizar las bandas de DNA una vez finalizada la corrida, en un transiluminador ultravioleta. Como el bromuro de etidio es mutagénico al manipular el gel se debe tener guantes, ya que podría provocar errores en la duplicación de nuestras células. Al estar la solución fundida se la volcó en el molde con el peine colocado, eliminando toda burbuja presente, y se esperó hasta que el gel solidifique completamente antes de ser usado (la agarosa al enfriarse forma interacciones entre las moléculas que al solidificarse forma una red). Luego se retiró el peine y se sacó la cinta de los bordes que deben estar en contacto con el buffer. Se colocó el gel en la cuba de electroforesis, y luego se le agregó suficiente cantidad de TAE 1x para cubrir todo el gel.

Preparación de la muestra:

Se utilizó el DNA plasmídico obtenido en el TP n° 3, resuspendido en agua MilliQ (en nuestro caso, sin RNasa), del cual se extrajeron con una micropipeta automática -(p20)- 7 μ l y se los agregó a un tubo eppendorf con 2 μ l de Loading Buffer (azul bromofenol 0,1%, glicerol 15%), mezclándolos cargando y descargando con la micropipeta. El azul de bromofenol es un colorante que permite ver la corrida (corre como si fuera tuviera 500 pb de peso, es decir, está en el frente de la corrida), durante la electroforesis, controlando que la muestra no se caiga del gel o no se dirija a otro pocillo. El glicerol es una sustancia viscosa que le provee mayor densidad a la muestra que se sembrará, evitando que difunda a través del buffer en que está inmerso el gel (o sea, que quede en el pocillo donde se siembra y se mantenga contenido en la calle). El Loading Buffer también contenía un colorante, xilen cyanol, que corre en la misma posición que lo haría una molécula de DNA de 3000 pb. Al tubo eppendorf conteniendo el plásmido y el buffer de siembra se le dio un spin (centrifugación de corto tiempo), para que la fuerza centrífuga lleve la solución al fondo del tubo y no queden gotas en la pared de éste.

Luego se cargó la pipeta con toda la muestra del tubo (evitando cargar burbujas de aire) y se la apoyó en uno de los bordes del pocillo del gel de agarosa, descargando su contenido en el pocillo (llegando sólo hasta el primer tope, nunca hasta el segundo para evitar la formación de burbujas).

Además de los plásmidos preparados por los grupos (algunos pretratados con RNasa y otros no), se sembraron marcadores de peso molecular conocido (markers), plásmidos pCR previamente digeridos con una enzima de restricción (BamHI), con dos (Bam HI y EcoRI,) o sin digerir, y el plásmido pYES (sin digerir).

Se conectó la cuba que contenía al gel a un electrodo, con el polo positivo en el lado opuesto al sitio de siembra. El buffer en que está inmerso el gel posibilita además que circule

corriente eléctrica, ya que presenta iones (el agua destilada no conduce electricidad, por eso no se puede utilizar como medio de corrida). Se corrió a voltaje constante (3-5 V/cm) hasta que el azul de bromofenol haya migrado aproximadamente 10 cm.

Luego, se apagó la fuente y se expuso al gel a radiación ultravioleta (colocado en un transiluminador ultravioleta). Entonces se le tomó una fotografía al gel para analizar y discutir los resultados luego.

Resultados y discusiones:

Tabla generada a partir de los datos brindados por el marker:

PM (pb)	log PM	Distancia (mm)
3054	3,485	19
2036	3,309	22
1636	3,214	24
1018	3,008	28
506	2,704	34
396	2,598	36

Con esta tabla de valores fue posible configurar el gráfico de log PM en función de la distancia. Luego, a partir de este gráfico y midiendo las distancias de ciertas bandas en el gel, se lograron los siguientes resultados:

-pCR cortado con BamHI (una banda)

Banda:

Distancia= 18mm

log PM= 3,54 (por Gráfico de log PM= f (distancia))

PM= 3467 pb (PM= $e^{\log PM}$)

De acuerdo a este resultado podemos decir que el peso aproximado de pCR es de 3467 pb

-pCR cortado con BamHI y EcoRI simultáneamente (dos bandas)

Banda Chica:

Distancia= 33mm

log PM= 2,78 (por Gráfico de log PM= f (distancia))

PM= 603 pb (PM= $e^{\log PM}$)

Banda Grande:

Distancia= 19mm

log PM= 3,48 (por Gráfico de log PM= f (distancia))

PM= 3020 pb (PM= $e^{\log PM}$)

Si sumamos los pesos correspondientes a ambas bandas, tenemos un peso total de 3623 pb. Este peso es igual (teniendo en cuenta el error de medición) al hallado a partir de la banda de pCR cortado con BamHI (3467 pb), lo cual era de esperar.

pYES sin cortar (tres bandas):

Una de las bandas corresponde a la forma lineal del plásmido (la del medio):

Distancia= 13mm

log PM= 3,8 (por Gráfico de log PM= f (distancia))

PM= 6310 pb (PM= $e^{\log PM}$)

El peso de 6310 pb es el esperado (en el TP se nos dio el dato del peso de pYES= 6200 pb), teniendo en cuenta los errores de medición.

Si se daña mecánicamente al DNA plasmídico cuando se pipetea la solución o al agitarla, se pueden cortar una o las dos cadenas del plásmido, por lo que se verán cambios en el patrón de la corrida: en vez de verse una sola banda (la correspondiente a los círculos covalentemente cerrados, o sea, las moléculas superenrolladas), se podrán ver dos bandas más, en el caso de que se corten algunas moléculas en una sola cadena y otras en las dos cadenas, o sólo una banda más si los plásmidos se cortan de una sola de las dos formas posibles. Vale aclarar que también puede haber formas intermedias, de acuerdo a esta diferente relajación de los plásmidos (es decir,

de acuerdo a la cantidad de nicks), pero posiblemente sólo podamos detectar tres como máximo ya que las formas intermedias estarán presentes en poca cantidad.

Las moléculas que más migran hacia el polo positivo son la superenrolladas, ya que pueden atravesar más fácilmente la red de agarosa (al ser más compactas) porque siempre chocan con ésta de igual forma. La banda intermedia que se revela al exponer el gel a luz UV corresponde generalmente a las moléculas lineales (ambas cadenas presentan nick) ya que en solución éstas rotan todo el tiempo y dependiendo de cómo atraviesan el gel se va a dar la migración. Por último, las moléculas que migran con menor intensidad hacia el polo positivo son las de círculo abierto (sólo tienen nick en una de las cadenas), ya que estas moléculas son más laxas y presentan por ello mayor dificultad para atravesar la malla del gel.

El patrón de tres bandas correspondientes a estas tres formas puede ser observado en las calles en que se sembró pYES sin digerir y pCR sin digerir. Ambos presentan tres bandas, pero en el primer caso abunda la forma círculo abierto mientras que en el caso de pCR abunda la forma lineal (eso podría deberse a que es un preparado viejo y está bastante dañado mecánicamente). En el caso de pYES pudimos comprobar que la banda intermedia correspondía a la forma lineal, ya que al calcular el PM según el gráfico, el resultado fue el peso del plásmido, dado como dato en el TP.

Si se trata a la preparación con el plásmido con una enzima de restricción que tiene un sitio de corte se observa una sola banda, que corresponde a la banda (si se trata del mismo plásmido) de moléculas lineales del plásmido sin digerir, ya que la enzima de restricción (si se la deja el tiempo suficiente y en condiciones óptimas) rompe la doble cadena de todos los plásmidos, por lo que las moléculas quedarán lineales y no habrá superenrolladas o laxas. Esto se puede observar en la calle en que se sembró pCR digerido con BamHI (un sitio de corte). Se ve que la banda es la misma en peso que la correspondiente a la forma lineal de pCR sin digerir.

Si al tratar una preparación de DNA plasmídico (del que no se conoce el mapa) con una enzima de restricción aparecen dos bandas no se puede asegurar que existan dos sitios de corte para esa enzima ya que puede cortar en un solo sitio y se puede cortar en otro sitio, generando otro fragmento, por acción mecánica al pipetear o al agitar la solución; también puede ser la solución no estuviera completamente purificada y presentara otra enzima de restricción, dando como resultado en la corrida dos bandas diferentes. En nuestro caso observamos dos bandas al cortar con dos enzimas de restricción que encontraran un sitio de corte cada una (pCR digerido con EcoRI y BamHI). Al calcular los pesos correspondientes a cada banda, comprobamos que la suma de ambos era igual al peso total del plásmido, según lo esperado.

Las calles correspondientes a las muestras cuyos plásmidos fueron resuspendidos en agua MilliQ (sin RNasa) (grupos 9, 10, 11, 12, 1, 3, 6 y 7) presentan una banda muy gruesa (la que más migró hacia el polo positivo) que corresponde a un chorreado de RNA, que distorsiona el tamaño de las bandas correspondientes al DNA y su forma de migración. Además las bandas de

DNA se tiñen menos porque el RNA acapara al bromuro de etidio. La banda de RNA es muy gruesa ya que hay moléculas de RNA de distintos tamaños que no fueron degradadas al no haber RNasa.

Las calles correspondientes a las muestras cuyos plásmidos fueron resuspendidos en agua MilliQ con RNasa (grupo 8, 2, 4 y 5) no presentan este chorreado, ya que la enzima corta a las moléculas de RNA en fragmentos muy cortos que migran muy rápido y caen del gel, por lo tanto las bandas de DNA se ven nítidas y no están distorsionadas como en los otros casos.