

PROTOCOL D'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA AMB MOSTRES D'**ADN**



PROTOCOL D'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA AMB MOSTRES D'ADN

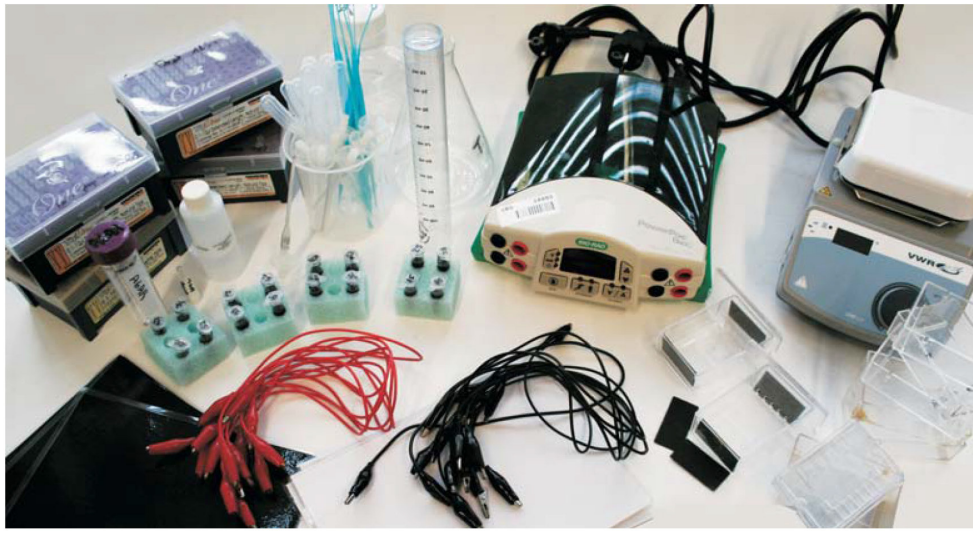


- Aquí es troba el protocol complet. Per tal d'adaptar-lo als horaris escolars específics de cada centre, és recomanable preparar alguns passos abans de la classe amb els estudiants (per exemple, els punts 1 i/o 3).
- També es pot dividir la pràctica en diferents sessions per a més comoditat i fer una pausa en els llocs indicats.
- La pràctica completa dura entre 45 min i 1 h 30 min.
- Al protocol següent es descriuen els requisits per a 8 gels (16 alumnes treballant en parelles). Cal ajustar els volums i les quantitats d'acord amb la grandària del grup de treball i el material que té a la seva disposició.
- Les mostres d'ADN subministrades amb aquest kit estan etiquetades com a A, B, C, D, E i F.





PROTOCOL D'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA AMB MOSTRES D'ADN



Material necessari per a la classe:

- 4 x 1 g d'agarosa
- 10 mL de TAE 50x
- 1 Erlenmeyer de 100 mL
- 1 ampolla/recipient de 100 mL
- 1 joc de balances (opcional)
- 1 microones o plat calefactor
- Mocadors de paper o guants (no es proporcionen amb el kit)
- 500 mL d'aigua destil·lada (no es proporcionen amb el kit)

Material necessari per a cada parell d'estudiants:

- 1 cubeta d'electroforesi
- 1 pinta amb almenys 6 pous
- 2 papers negres conductors d'aprox. 4 x 2 cm
- 2 cables elèctrics: 1 negre, 1 vermell
- 9 piles de 3 V o una font de corrent continu
- 1 micro-xeringa
- 6 puntes de pipeta de 10 µL
- 1 tira de 5 o 6 mostres amb 40 µg d'ADN preparades per carregar (amplificades per PCR, digerides amb enzims de restricció, amb colorant i glicerol), procedents d'Edvotek, referències: 109, 130 (perfils genètics) o 115 (càncer).
- 1 tros de paper blanc i un de negre (A5 plastificat)
- 1 regle
- 1 safata de plàstic per a tinció
- 1 pipeta Pasteur





PROTOCOL D'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA AMB MOSTRES D'ADN

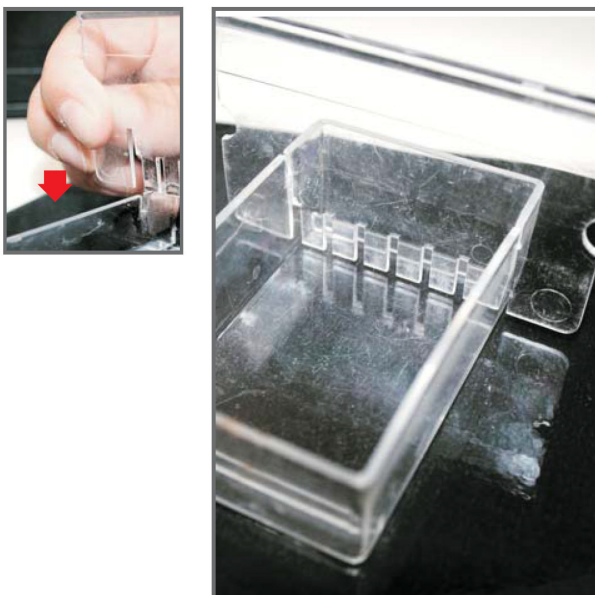
1 Preparar la solució TAE 1x

- Si es prepara la solució per a tota la classe: dilueu 10 mL de TAE (50x) en 490 mL d'aigua destil·lada.
- Si es prepara la solució per a 4 estudiants / 2 gels: dilueu 2 mL de TAE (50x) en 98 mL d'aigua destil·lada.



2 Preparar la cubeta d'electroforesi

- Col·loqueu la pinta amb els 6 pouets a la ranura.
- Col·loqueu la cubeta sobre el paper negre.



3 Preparar el gel d'agarosa al 0,8%

- Si es prepara la solució per a 6 gels:
 - Peseu 1 g d'agarosa en pols
 - Barregeu amb 125 mL de TAE (1x)
- Si es prepara la solució per a 4 estudiants / 2 gels:
 - Peseu 0,3 g d'agarosa en pols
 - Barregeu amb 42 mL de TAE (1x)
- Escalfeu al microones (± 2 minuts) o en un plat calefactor (± 20 minuts), fins que la solució es torni transparent.

¡COMPTE! LA SOLUCIÓ POT ESTAR MOLT CALENTA,
Feu servir guants especials o mocadors de paper.

- Aboqueu la solució en la cubeta d'electroforesi, fins que arribi a l'alçada de les dues parets petites.
- Espereu uns 5 minuts fins que el gel es torni sòlid i apareixi més opac.

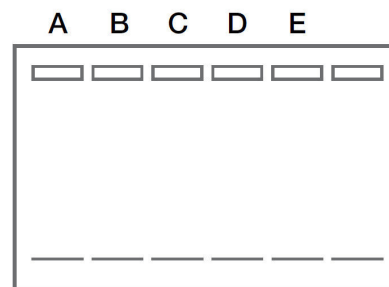


Punt d'aturada: podeu cobrir el gel amb solució TAE i guardar-lo durant uns dies a la nevera.

PROTOCOL D'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA AMB MOSTRES D'ADN

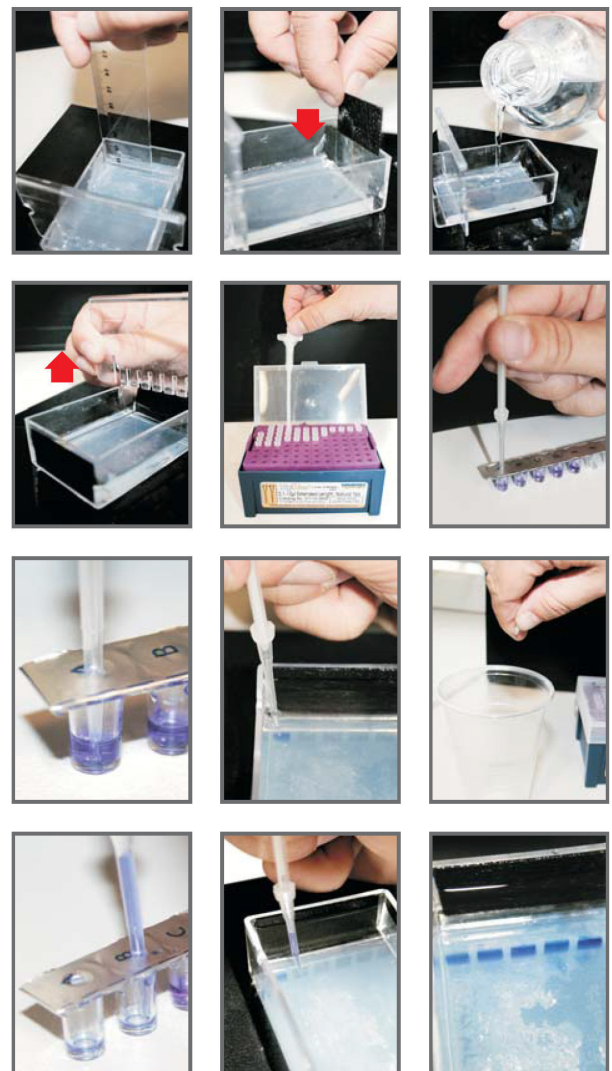
4 Diagrama

- Dibuixeu un diagrama de l'ordre en què es col·loquen les mostres que s'han de fer desplaçar pel gel.



5 Carregar les mostres

- Talleu el gel que ha sobrepassat els límits de les parets laterals fent servir un regle.
- Col·loqueu un paper negre conductor en cada extrem de la part interna de la cubeta.
- Aboqueu la solució TAE 1x sobre el gel fins a cobrir-lo.
- Retireu la pinta lentament i en posició vertical.
- Agafeu la micro-xeringa i col·loqueu una punta de 10 μ L a l'extrem.
- Agafeu tant com es pugui de la primera mostra (aproximadament uns 40 μ L).
- Col·loqueu la mostra en el primer pouet (o a on s'hagi decidit al punt 4). Assegureu-vos de fer-ho amb suavitat.
- Carregueu les altres mostres en la resta de pouets. No oblideu canviar la punta de la pipeta cada cop.





PROTOCOL D'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA AMB MOSTRES D'ADN

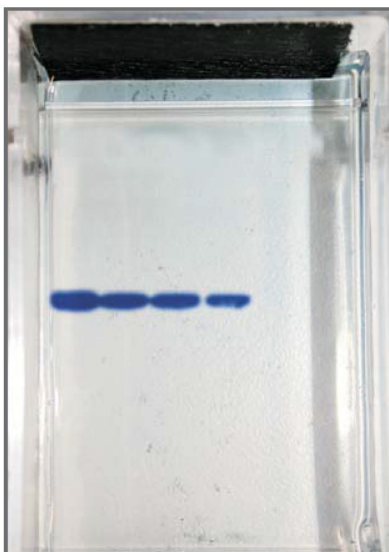
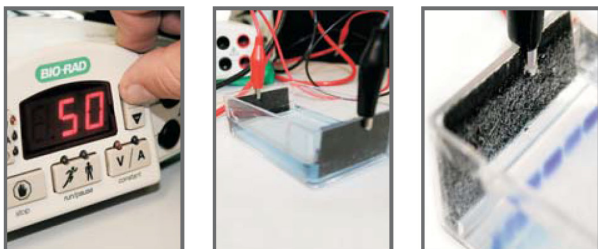
6 Còrrer el gel

- Col·loqueu la font d'alimentació a 50V.

¡COMPTE! La cubeta de plàstic no suporta més de 50 V.
¡No feu servir un voltatge superior!

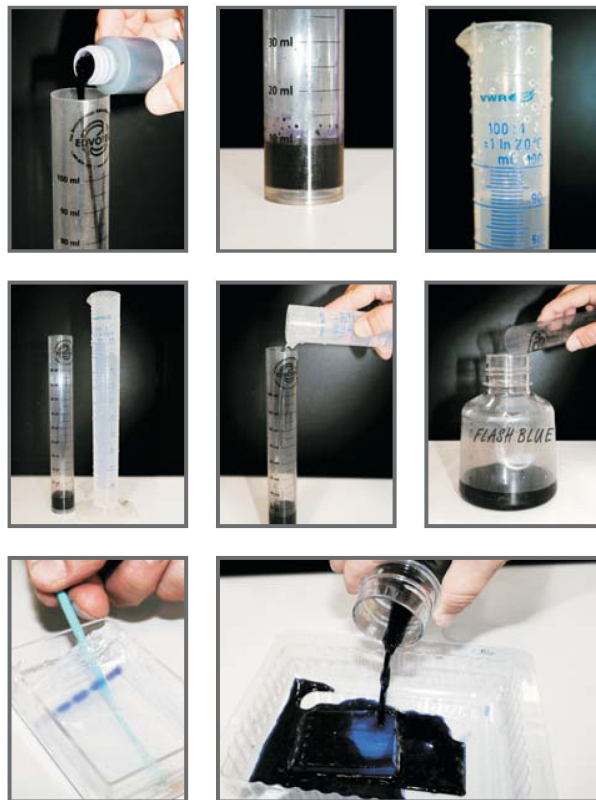
- Connecteu els cables fent servir el codi de color: **Negre (negatiu)**, al començament de la cubeta, a prop de les mostres.
Vermell (positiu), al final, lluny de les mostres.
- Connecteu el corrent (premeu el botó *Run*).
- Espereu uns 20 minuts, fins que es vegi la línia frontal blava a la meitat del gel.

¡COMPTE! Premeu *Pause* si heu de connectar una nova cubeta i després torneu a prémer *Run*.



7 Tenyir el gel

- Prepareu una solució de tinció 1x:
Diluiu 20 mL de colorant blau (concentració 10x en 180 mL d'aigua destil·lada. (Si es prepara la solució per a tota la classe). O diluiu 5 mL de colorant blau (10x) en 45 mL d'aigua destil·lada (si es prepara la solució per a 4 estudiants / 2 gels)
- Amb molt de compte, traieu el gel fora de la cubeta i col·loqueu-lo en una safata de tinció de plàstic.
- Submergiu el gel en la solució de colorant blau durant 4 minuts.



PROTOCOL D'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA AMB MOSTRES D'ADN

8 Destenyir el gel

- Traieu la solució blava (podeu retornar-la al seu recipient i reutilitzar-la si cal).
- Submergiu el gel en aigua destil·lada durant 20 minuts, canviant l'aigua cada 5 minuts.



Punt d'aturada: els passos de tinció i decoloració poden ser més llargs o més curts en funció de la concentració de la solució. Una opció és tenyir durant la nit amb una solució 10 vegades menys concentrada de blau de metilè.

9 Lectura dels resultats

- Col·loqueu la cubeta sobre el paper blanc per poder observar el resultat amb més claredat.

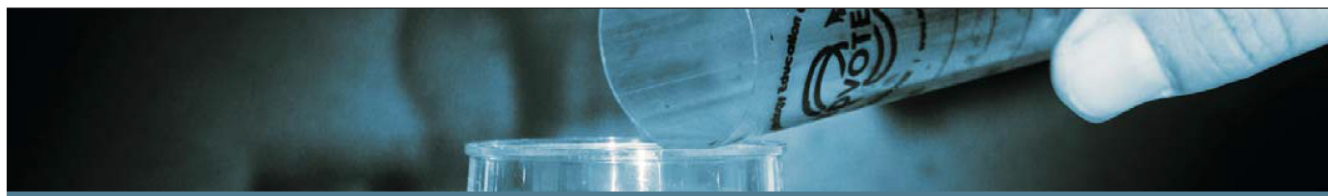
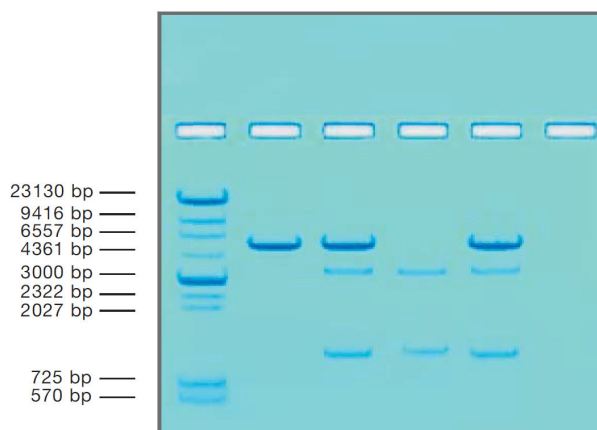
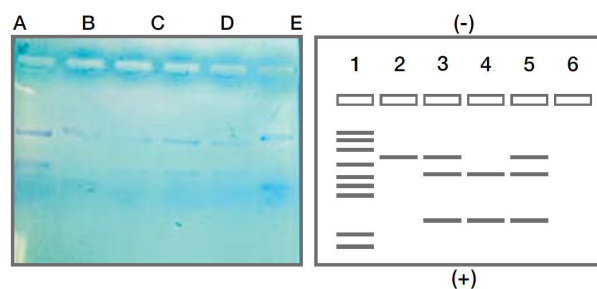
Observacions

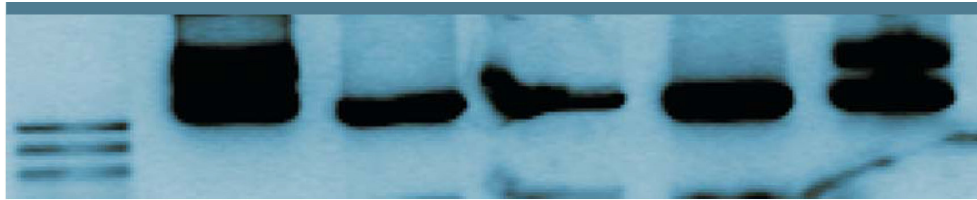
L'ADN està carregat negativament.

La mida de l'ADN afecta la seva mobilitat a través del gel d'agarosa sotmès al camp elèctric.

Les molècules més grosses migren més lentament perquè experimenten una major resistència per part del gel. Les molècules més petites, en canvi, troben menys resistència i es desplacen més.

La primera columna, A, correspon als fragments de l'ADN de referència que farem servir per comparar amb els nostres resultats.





PROTOCOL D'ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA AMB MOSTRES D'ADN

Conclusions

L'electroforesi és una tècnica que permet separar les mostres d'ADN segons la seva grandària.

Podem veure que algunes de les llargàries de les cadenes d'ADN són diferents. Algunes mostres tenen cadenes d'ADN d'una sola llargària, mentre que d'altres tenen 2 o 3.

Si comparem la migració de la mostra amb la primera línia o amb els ADN de referència (ref 130-115), poden «mesurar» les cadenes d'ADN.

El blau de metilè s'uneix a les molècules d'ADN i les fa visibles.

Ref 109: les mostres A i B tenen el mateix patró de digestió que E i F; l'ADN del Sospitós 2 és similar a l'ADN de l'Escena del Crim.

Ref 130: la mostra B té el mateix patró que l'Escena del Crim. L'ADN del Sospitós 2 i el de l'Escena del Crim, amplificats per PCR, presenten similitud en aquestes regions d'ADN i en els encebadors específics.

Ref 105: El pacient 1 (B) és homozigot i no presenta el gen mutat en cap dels dos al·lels. Els pacients 2 i 4 (C i E) són heterozigots i tenen un al·lel mutat. El pacient 3 és homozigot i presenta els dos al·lels mutats.

Qüestions

1. Què és la solució TAE? Quina és la seva composició?
2. Quines propietats especials ha de tenir el gel d'agarosa?
3. Què creus que passaria si es fes servir un gel d'agarosa al 2%? Les mostres es desplaçarien amb més facilitat o no? Per a què creus que podria ser útil?
4. Per a què s'utilitza el blau de metilè? Fes un llistat dels avantatges i desavantatges del seu ús, tot comparant-lo amb el bromur d'etidi i el SYBR Green.
5. Les mostres d'ADN que es fan servir a la pràctica són subministrades per una empresa biològica. Per preparar-les s'utilitzen diferents tècniques. Explica-les breument.
 - a. Extracció d'ADN.
 - b. PCR.
 - c. Digestió amb enzims de restricció.
6. Abans de sembrar les mostres d'ADN en el gel, se'ls hi ha d'afegir el colorant blau i el glicerol. Pots explicar per què?
7. Aquestes mostres no són d'ADN humà, sinó de plasmidis preparats especialment per a propòsits educatius. Els plasmidis es fan servir molt en biotecnologia. Busca alguna de les seves aplicacions

Referències

Carolina.com: references 211026: discover electrophoresis kit
Edvotek.co.uk: referències 109, 130 i 115