

## **GEL DE POLIACRILAMIDA**

### **A) Preparación del soporte del gel:**

Para hacer el gel se utilizan dos láminas de vidrio (cristal en "U" y cristal recto) unidas con cinta adhesiva. Estas láminas son diferentes, se preparan y manipulan de forma distinta.

Es fundamental que los cristales estén extremadamente limpios. En el momento del montaje darle un repaso con etanol 96% y secarlos.

#### **Limpieza y preparación del cristal en "U" (vidrio repelente):**

- Este cristal tiene un repelente que no hay que estropear (el vidrio está curado) por lo que, normalmente, no se lava antes de trabajar con él salvo que haya pasado mucho tiempo desde su última utilización. Sí se lava después de hacer el gel.
- Lavar el vidrio con estropajo reservado para él y con guantes exclusivos, para evitar contaminaciones. Utilizar para el lavado lavavajillas convencional.
- Lavar el vidrio sabiendo qué cara tiene el repelente, que es la que se manipula con el estropajo exclusivo. Procurar no tocar la cara que no tiene repelente con este estropajo.
- Secar con papel para quitar el agua y luego limpiar con etanol al 96% dejándolo bien seco, siempre con los guantes de este vidrio.
- Colocar sobre el vidrio unas gotas de repelente (Repel-Silane ES) con una pipeta desechable (pipeta Pasteur), reservada para esto. Esparcir por el vidrio con papel, sólo por la cara donde se va a trabajar. Dejar que seque.

#### **NOTAS:**

- Si el vidrio ha sido limpiado en profundidad el día anterior a su utilización, antes de poner en él el repelente se volverá a limpiar con etanol.
- Para "curar" un vidrio en "U" tenemos que 5 días después de haberlo limpiado bien y haberle dado con etanol al 96%, aplicar una capa de repelente cada hora aproximadamente secándolo muy bien. Si lo vamos a dejar varios días antes de su uso conviene también darle con isopropanol frío después del repelente. Se deja hasta el día en que se vá a usar y comenzamos como se hace habitualmente (etanol al 96% y luego repelente).

#### **Limpieza y preparación del cristal recto (vidrio adherente):**

- Es el cristal en el que se hace realmente el gel.
- Lavar con esponja exclusiva y lavavajillas convencional. Usar para este lavado los guantes que se tienen puestos.
- Secar con papel para quitar el agua y luego limpiar con etanol al 96% dejándolo bien seco.

- Aplicar sobre una de las caras del vidrio la solución adherente y esparcir cuidadosamente sobre ella con la ayuda de un papel.

\* Solución adherente:

- En un tubo eppendorf disponer 1 ml de ácido acético 5%-etanol 95%.
- Añadir al tubo anterior 3  $\mu$ l de pegamento (Bind Silane).
- Agitar la mezcla por inversión.

NOTAS:

- Recordar que las esponja de éste vidrio no debe tocar la del vidrio en "U" por lo que se colocarán en bandejas separadas.
- 50 ml de solución adherente son 47,5 ml de etanol absoluto (95%) + 2,5 ml de ácido acético (5%)

### **Montaje del soporte:**

- Colocar sobre la cara adherente del vidrio recto los separadores de plástico en los márgenes laterales y el peine (mirando los dientes hacia arriba) en el margen superior, procurando que las aberturas de éste queden alineadas, en su mitad, con el borde del vidrio.
- Colocar encima el vidrio en "U" de manera que la cara repelente de éste esté en contacto con la cara adherente del vidrio recto.
- Unir los cristales con cinta adhesiva por los laterales y doble capa en la parte inferior. Apretar con espátula la cinta adhesiva para que quede bien adherida, eliminando las arrugas. Doblar bien las esquinas, evitando que sobresalgan.

### **B) Preparación y polimerización del gel:**

- Pesar en un vaso de precipitados 35g de urea.
- Medir en una probeta 15 ml de acrilamida unida con bisacrilamida (es decir, poliacrilamida, ojo, es neurotóxico en estado líquido). Se guarda en la nevera a 4°C.
- Añadir la acrilamida-bisacrilamida a la urea.
- Añadir a la urea 15 ml TBE5x (triborato de EDTA, ácido etilendiaminotetraacético).
- Enrasar hasta 70 ml con agua destilada (marca en vaso de precipitado).
- Agitar la mezcla en agitador con mosca.
- Cuando se ha disuelto toda la urea añadir a la mezcla:

$\mu$ l de persulfato de amonio al 25%.

µl de TEMED

Estos productos polimerizantes se añaden en el orden anterior .

Si la mezcla de poliacrilamida está muy caliente se añade menos cantidad de los productos anteriores para evitar una rápida polimerización. También es conveniente poner menos cuando uno se inicia en la técnica, así tiene más tiempo de actuación (130 ul).

- Una vez añadidos el persulfato y el TEMED a la poliacrilamida agitar un poco la mezcla y verterla sobre el soporte. Para verter la poliacrilamida en el soporte previamente retirar el peine (ver preparación del soporte del gel). Ojo con las burbujas!!!, si se producen hay que irlas sacando.

- Colocar el soporte en horizontal. En este momento el exceso de mezcla saldrá por la parte superior, se irá limpiando con ayuda de papel y cuando deje de gotear se humectará (con el propio gel) bien toda la zona por donde hay que introducir el peine en el gel.

- Volver a colocar el peine, con los dientes hacia arriba y orificios (hacia su mitad) alineados con el borde del vidrio y evitando la formación de burbujas.

- Colocar pinzas en la parte superior hacia los extremos.

- Dejar polimerizar el gel durante una hora.

#### NOTAS:

- La poliacrilamida debe estar lista cuando el soporte del gel esté preparado.

- La poliacrilamida, el persulfato, el Bind Silane y ácido acético 5%-etanol 95% se guardan en la nevera (4°C).

- Para preparar TBE5x (Triborato de EDTA – ácido etilendiamino tetracético-)/2l prepararemos una disolución como sigue:

tribórico)

(EDTA sal disódica 2-hidratada.)

\* Tris Base: 108 g

\* Ácido Bórico: 55 g (ácido

\* Na<sub>2</sub>EDTAx2H<sub>2</sub>O: 9,3 g

\* H<sub>2</sub>O destilada: 2 l

- No mezclar reactivos de casas diferentes

- TBE5x se deteriora, precipita..., con el tiempo, por ello es conveniente hacerlo nuevo, esto puede evitar geles no deseados, con bandas desplazadas...

- Para preparar persulfato de amonio al 25% pesar 0,25g de persulfato y diluir en 1 ml de agua miliQ.

#### C) Calentamiento del gel:

Una vez polimerizado el gel, se pasa a calentarlo a través de una electroforesis.

- Retirar las pinzas y cintas adhesivas del soporte. Puede retirarse solo la cinta inferior si se desea y el resto de cintas al teminar la electroforesis. Esto último es más recomendable.

- Retirar el peine poco a poco, con sumo cuidado y todo él a la vez. Para esto ayudarse de agua y espátula con la que se va tirando cuidadosamente.

- Limpiar con agua las marcas que ha dejado el peine en el vidrio adherente. Ayudarse de espátula envuelta en papel.

- Limpiar con agua, en el grifo, el peine, posteriormente secarlo cuidando que no se rompan los dientes, para ello limpiar esta parte en el sentido de los dientes.

- Colocar el gel en la cámara de electroforesis con el cristal adherente hacia delante.

- Ajustar la cámara de electroforesis, todos los tornillos más o menos el mismo ajuste y no al máximo. Poner los cartones por detrás de los topes para que ajusten mejor.

- Añadir TBE1x en la cubeta inferior hasta llegar a la línea negra. Añadir también en la cubeta superior y apretar para que no se escape. De nuevo no ajustar al máximo.

- Rellenar la cubeta superior hasta el borde inferior de la "U" del vidrio repelente y limpiar el borde de dicho cristal con pipeta Pasteur para eliminar restos de poliacrilamida.

- Clavar el peine en el frente para hacer los pocillos donde cargaremos las muestras. Dejar un poco de pocillo libre por encima del cristal en "U" para cargar las muestras (que quede por encima del borde superior del cristal repelente).

- Marcar los pocillos donde vamos a poner las muestras en el cristal. Estas marcas deben ser utilizadas para hacer un esquema en papel del gel.

- Colocar en algunos/todos los pocillos un poco de azul de bromofenol con formamida para ver si hay pocillos interconectados, cómo es la migración... Este paso es opcional.

- Calentar el gel durante 40-60 min a través de una electroforesis a 100W.

#### NOTAS:

- Al sacar el peine comprobar cómo es el frente, de él dependerá, en parte, como será el gel. Debería ser un frente regular y ni muy alto ni muy bajo, por eso es fundamental la colocación correcta del peine antes de la polimerización del gel.

- La cámara de electroforesis no ajusta bien por lo que nos ayudamos para su cierre de dos cartones.

- La pipeta Pasteur utilizada para limpiar es distinta de la utilizada para poner el repelente.
- La cámara de electroforesis lleva un termómetro para mantener temperatura constante, la máquina cambia amperaje y voltaje. No hay termómetro, entonces usamos una potencia constante (en este caso 100 W).
- Conectar electrodos de izquierda a derecha en puntos de conexión del aparato.
- Encender. Manual, constant V, 100W, run.

**D) Preparación de las muestras para cargar en el gel de poliacrilamida y realizar electroforesis:**

Mientras se va calentando el gel se preparan las muestras.

- Sobre una placa múltiple de pocillos cónicos disponer las muestras para posteriormente pasarlas al gel de poliacrilamida y realizar la electroforesis.
- Colocar 2  $\mu$ l de azul de bromofenol-formamida (la formamida no se puede aplicar en los geles de agarosa porque desnaturaliza, pero aquí sí) en cada uno de los pocillos que vayan a contener muestras. No olvidar poner azul para la muestra control.
- Añadir 5  $\mu$ l de cada muestra de AFLP+3 a cada pocillo, para el control solo 3  $\mu$ l.
- Tapar la gradilla con un caucho que se reterirá en el momento de cargar las muestras en el gel.
- Colocar las muestras en el termociclador durante 3 min a 94°C para que se abran las cadenas del ADN.
- Pasar a hielo para mantenerlas abiertas. Ojo!!! Es muy importante hacer este paso nada más terminar el termociclador. Se cargarán estando en el hielo.
- Limpiar pocillos (1° con pipeta Pasteur y luego con pipeta de 20-200  $\mu$ l, en 150  $\mu$ l ) para eliminar restos de urea.
- Cargar muestras. No olvidar poner el marcador de peso (escalera de ADN de concentración conocida).
- Cerrar la cámara de electroforesis, conectarla y realizar la electroforesis al menos durante 2 h.

**NOTAS:**

- En la preparación de las muestras para su desnaturalización utilizaremos la misma punta (al ser 5  $\mu$ l de muestra los utilizados, utilizar pipetas amarillas, son más baratas) en una serie, aunque se cambiarán cada 5-6 muestras.
- Al cargar las muestras con el gel todas con la misma punta. Puntas blancas, se limpia la punta en el tampón cada vez que se carga una muestra.

- La muestra control se puede colocar en el termociclador o poner directamente sobre el gel.
- El programa de termociclador, utilizado en esta fase es: usuario, AFLP, GELPO.
- Toda la preparación de muestras se realiza con pipetas PCR excepto la carga del gel de poliacrilamida.
- Poner un poco de agua del grifo en la bandeja del hielo.
- El tiempo de duración de la electroforesis va a variar dependiendo de la migración de las muestras.

### **Desconexión y desarme de la cámara**

- Levantar tapa superior (izquierda y luego hacia arriba). Sacar peine.
- Sacar todo el TBE1x y tirar.
- Desatornillar los tornillos a la vez. Abrir tapa de abajo.
- Quitar cinta adhesiva (si aún continúa puesta). Separar vidrios (difícil), sabiendo el lado del vidrio que tiene el repelente.
- Limpiar toda la cámara con papel y alcohol.

## TINCIÓN DEL GEL CON NITRATO DE PLATA

- **Fijación:** etanol 10% durante 10 min. Mover constantemente la batea.
- **Oxidante:** HNO<sub>3</sub> 1% durante 5 min. Mover constantemente la batea.
- **Lavado:** lavado corto con agua destilada (15-20 seg).
- **Tinción con plata:** Agitarlo bien antes de echarlo a la batea y mover ésta durante 30 min. Tapar la batea con un cartón.
- **Lavado:** en agua destilada no mayor de 10 seg (se borrarían las bandas si se deja más tiempo).
- **Revelador:** Agitar primero el revelador viejo y echarlo. Aquí ya no controlas tiempo sino lo que te tarden en aparecer las bandas. Se decanta cuando se forma un precipitado negruzco y entonces agitamos el revelador nuevo y se vierte a la batea hasta ver aparecer las bandas con la intensidad deseada.
- **Parada:** ácido acético 10% durante 5 min o más. Para fijar el revelado
- **Lavado:** tras el fijador se hace un lavado en agua destilada para eliminar los restos de acético, quitando además el mal olor.

### NOTAS:

- El gel se pone hacia arriba en las bateas.
- Todos los productos se guardan fuera de la nevera salvo el fijador.
- Cada vez que se va a teñir hay que preparar 2 litros de revelador, una vez preparados se guardará en la nevera junto con el revelador viejo (hasta ese momento habrá estado fuera).
- El nitrato de plata solo se reutiliza 2 veces. Éste debe estar en oscuridad por eso la garrafa donde se almacena está forrada con bolsas negras y por eso la batea que lo contiene, durante la tinción, se tapa con un cartón.
- Hay que mover constantemente las bateas en todos los pasos.
- La bandeja del Ácido Nítrico pasa a ser la del revelador y la de etanol la de acético.

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DE LA TINCIÓN

Preparar de todos los reactivos 2 litros.

- **Etanol 10% (para 2 litros):** Se reutiliza hasta un máximo de 10 veces.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$96\% \times V = 10\% \times 2; V = 20/96 = 0,21 \text{ l} = 210 \text{ ml}$$

- **Ácido Nítrico (para 2 litros):** Preparar en campana de gases. Reutilizar 2 veces.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$65\% \times V = 1\% \times 2; V = 2/65 = 0,031 \text{ l} = 31 \text{ ml}$$

- **Nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>):** Añadir 2,02 g/l (vol total 2 l). Hacerlo en el agitador magnético para que quede bien disuelto que si no puede dar problemas de tinción. Reutilizar 2 ó 3 veces.

- **Revelador (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con formaldehído):** Se añade 29,6 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (sin agua) por cada litro y se agita en con el agitador magnético. Un poquito antes de usar se añade 540 µl de formaldehído al 37% por cada litro.

- **Ácido Acético al 10%.** Diluir 200 ml de ácido acético en 1800 ml de agua destilada. Se reutiliza hasta que se vuelva gris.