

# ecogen

Making lab life easier

## **CUBETAS HORIZONTALES** *(tanques horizontales para electroforesis de gel de agarosa)*

**MODELOS: E1, E3, E4, E4MT, E5, E6**

# **MANUAL de INSTRUCCIONES**

*Rev. 04-2020*



### **¡ADVERTENCIA!**

ESTAS UNIDADES SON CAPACES DE ENTREGAR VOLTAJE POTENCIALMENTE PELIGROSO CUANDO SE CONECTAN A UNA FUENTE DE ALIMENTACIÓN Y DEBEN SER MANEJADAS SOLAMENTE POR PERSONAL TÉCNICAMENTE CAPACITADO Y FORMADO

LEA TODO EL MANUAL DEL USUARIO COMPLETAMENTE ANTES DE UTILIZAR ESTE APARATO.

Ecogen no es responsable de ninguna lesión o daño causado por el funcionamiento de este sistema de electroforesis de una manera no especificada en este manual.

**ecogen Barcelona**

tel. **93 450 26 01**

902 450 260

fax 93 456 06 07

Ptge. Dos de Maig, 9-11 . 08041 Barcelona

E-mail: [ecogen@ecogen.com](mailto:ecogen@ecogen.com)

**ecogen Madrid**

tel/ **91 444 06 62**

fax/ 91 594 02 82

San Hermenegildo, 16 Esc. 1, 1º B .28015 Madrid

E-mail: [ecogenm@ecogen.com](mailto:ecogenm@ecogen.com)

# Índice

Garantía .....	3
Precauciones .....	3
Medio ambiente y condiciones de uso .....	3
Limpieza y cuidado .....	3
Avsio! .....	3
Introducción.....	4
Especificaciones.....	4
Instrucciones de manejo .....	6
Configurar .....	6
Funcionamiento.....	7
Visualización .....	7
Limpieza .....	8
Preparación & Propiedades de tampones TAE y TBE .....	8
Preparación de agarosa.....	8
Cantidad .....	9
Porcentaje de agarosa y separación de fragmentos de DNA .....	9
Bromuro de Etidio.....	9
Carga del tampón (Buffer)/Muestra.....	9
Marcador de peso molecular .....	10
Consejos.....	10
Correr el marcador-ladder.....	10
Carga de muestras.....	10
Opciones de peines .....	10
Formato microtiter .....	10
Resolución problemas .....	11
Compatibilidad química del Acrílico ó PMMA .....	12

## ¡ADVERTENCIA!

### Notas de traducción:

En este manual tiene el mismo significado en los siguientes términos:

- cuando se refiere a cubeta horizontal o tanque horizontal.
- Cuando se refiere a tampón o buffer
- Cuando se refiere a tampón de carga, buffer de carga.
- Cuando se refiere a marcador, escalera o ladder
- Cuando se refiere a colorante, tinte o dye
- Cuando se refiere a coloración o tinción
- Cuando se refiere a portagel o bandeja portagel
- Cuando se refiere a unidad, sistema o conjunto de electroforesis

Se refiere a unidad de electroforesis a todo el material entregado junto con los accesorios.

## Garantía

Ecogen garantiza que la unidad de electroforesis horizontal que recibió ha sido probada exhaustivamente y cumple con las especificaciones publicadas.

Inmediatamente a su llegada, verifique cuidadosamente para ver si la unidad se ha recibido completa y no se ha dañado durante el envío. Consulte este manual para confirmar que la unidad se ha recibido con todos los accesorios. Para informar cualquier tipo de daño, notifique a Ecogen o a su distribuidor. Conserve todos los materiales de embalaje hasta que la entrega se haya verificado por completo, esto acelerará la devolución de los bienes si es necesario y reducirá el impacto ambiental.

Esta garantía es válida por 24 meses sólo si el producto y las funciones se han utilizado de acuerdo con el manual del usuario. No se acepta responsabilidad por pérdidas o daños derivados del uso incorrecto. La responsabilidad de Ecogen se limita a la reparación o el reemplazo de la unidad o al reembolso del precio de compra. Ecogen no es responsable de ningún daño por negligencia del usuario.

Ecogen se reserva el derecho de modificar las especificaciones las unidades de electroforesis horizontal sin previo aviso.

## Precauciones de seguridad

Lea atentamente el Manual del usuario antes de utilizar la unidad de electroforesis horizontal. Este manual contiene información importante de operación y seguridad. Nuestras unidades de electroforesis están diseñadas para funcionar sin problemas durante años en los laboratorios más exigentes. Tómese el tiempo de leer el manual para asegurarse de que comprende las instrucciones de seguridad y operación. Las alteraciones pueden causar lesiones graves al usuario o al sistema.

La alimentación a la unidad es suministrada por una fuente de alimentación externa. La fuente de alimentación debe cumplir con los estándares de seguridad de las normas IEC 1010-1 y debe estar puesta tierra e incorporar un circuito de detección sin carga (circuito abierto).

### ¡ADVERTENCIA!

o Se suministra energía eléctrica a través de la tapa de seguridad puesta en horizontal o cerrada. Los usuarios no deben intentar operar esta unidad con la tapa abierta. Siempre desconecte los cables antes de levantar la tapa.

o Mientras no se utilice la fuente de alimentación mantener fuente apagada para evitar cualquier riesgo de choque eléctrico. Después de usar, aisle o apague la fuente de alimentación y luego desconecte los cables de alimentación.

o Las condiciones de funcionamiento no deben exceder la tensión o corriente máxima de funcionamiento.

o No llene las unidades con tampón de transferencia más de 3mm sobre el gel.

o Siempre desconecte la unidad de la fuente de alimentación cuando desee mover la unidad o agregar búfer en funcionamiento.

o Use este aparato solo para el propósito previsto como se describe en este manual. No use este producto si los cables de alimentación están dañados o si alguna de sus superficies está agrietada.

## Condiciones ambientales de uso

o Esta unidad está diseñada solo para uso en interiores.

o Esta unidad puede funcionar de forma segura a una altitud de 2.000 m.

o El rango normal de temperatura de funcionamiento es entre 4°C y 65°C.

o Humedad relativa máxima del 80% para temperaturas de hasta 30°C.

### Cuidado general y limpieza

o Antes de usar, limpie y seque la unidad **SOLAMENTE CON AGUA DESTILADA**; secar con un paño limpio o al aire libre. Tenga cuidado al limpiar o secar la unidad cerca del cable de platino. Los conectores deben estar limpios y secos antes de su uso o almacenamiento.

o No use cremas abrasivas ni estropajos.

o No utilice cepillos de limpieza en el área del electrodo.

o Un enjuague completo con agua destilada es todo lo que generalmente se requiere para limpiar la unidad después de su uso. También se puede usar un detergente suave.

**¡ADVERTENCIA!**

El metacrilato (acrílico) no es resistente a hidrocarburos aromáticos o halogenados, cetonas o ésteres. Los solventes orgánicos provocan que el acrílico se o agriete. No use etanol u otros solventes orgánicos para limpiar su unidad. No esterilice en autoclave, ni en el microondas su unidad. Consulte la tabla de compatibilidad química al final del manual para obtener nuestra evaluación más completa de los productos químicos de laboratorio y su efecto sobre el acrílico.

**Introducción**

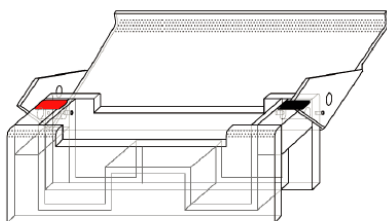
**Sistemas de gel horizontal**

Las cubetas horizontales de Ecogen tienen una gran capacidad y son ideales para laboratorios con grandes conjuntos de muestras de ADN o ARN, o laboratorios que necesitan resolver claramente las muestras que contienen una gran cantidad de fragmentos. Estos sistemas están fabricados con los mejores materiales e incluyen características de diseño innovadoras que los convierten en una herramienta esencial en el laboratorio de investigación de ciencias de la vida.

Ecogen también ofrece una amplia variedad de peines

**Especificaciones**

**Modelo E1**



Tamaño del gel: 6'5 cm x 8 cm

El sistema completo incluye:

- Cámara de electroforesis. Dim. externas: 24x11'5x8'5 cm
- Portageles UVT 6'5x8 cm, 3 posiciones fijas del portapeines (ref.:E1B080)
- Peine 6/10 dientes; 1'5 mm de grosor (ref.:E1P061015)
- Portapeines (ref.:E1P)

**Accesorios modelo E1**

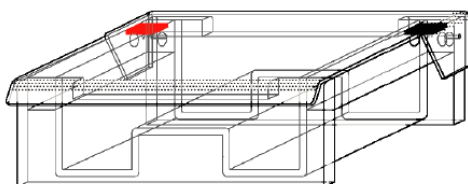
Portageles UVT 6'5x10 cm con tres posiciones	E1B100
Portageles UVT 6'5x8 cm con tres posiciones	E1B080
Cables de corriente (par)	MT1010
Portapeine	E1P

**Peines Opcionales modelo E1**

nº diente	grosor (mm)	vol. pocillo (ul) *	ref.:
6/10	1	30/20	E1P06101
6/10	1'5	45/30	E1P06101
6/10	2	60/40	E1P06102
8/10	1'5	37'5/30	E1P08101
13/16	1'5	27'5/15	E1P13161

\* Volumenes calculados con un gel de 5 mm de

**Modelo E3**



Tamaño del gel: 15 cm x 11 cm

El sistema completo incluye:

- Cámara de electroforesis. Dim. externas: 24x21x8'5 cm
- Portageles UVT 15x11 cm, 3 posiciones fijas del portapeines (ref.:E3B110)
- Peine 16/20 dientes; 1'5 mm de grosor (ref.:E3P162015)
- Portapeines (ref.:E3P)

**Accesorios modelo E3**

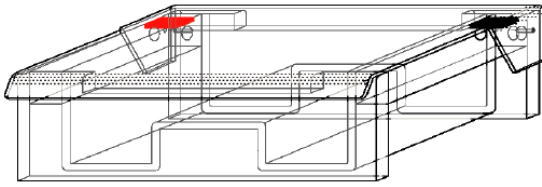
Portageles UVT 15x11 cm con tres posiciones	E3B110
Portageles UVT 15x12'5 cm con tres posiciones	E3B125
Cables de corriente (par)	MT1010
Portapeine	E3P

**Peines Opcionales modelo E1**

nº diente	grosor (mm)	vol. pocillo (ul) *	ref.:
16/20	1	30/22'5	E3P16201
16/20	1'5	45/34'5	E3P16201
16/20	2	60/45	E3P16202
10/30	1'5	82'5/22'5	E4P10301
25/30	1'5	30/22'5	E3P25301

\* Volumenes calculados con un gel de 5 mm de

### Modelo E4/E4MT



Tamaño del gel: 15 cm x 18 cm

El sistema completo incluye:

- Cámara de electroforesis. Dim. externas: 36'5x20x10 cm
- Portageles UVT 15x18 cm, 3 posiciones fijas del portapeines (ref.:E4B180)
- Peine 16/20 dientes; 1'5 mm de grosor (ref.:E3P162015)
- Portapeines (ref.: E3P)

#### Accesorios modelo E4

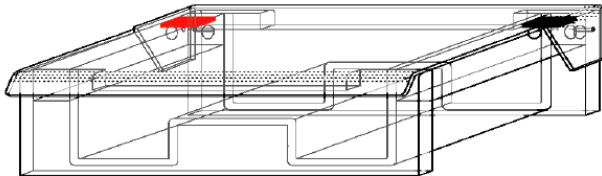
Portageles UVT 15x11 cm con tres posiciones	E3B110
Portageles UVT 15x12'5 cm con tres posiciones	E3B125
Portageles UVT 15x18 cm con tres posiciones	E4B180
Portageles UVT 15x20 cm con tres posiciones	E4B200
Portageles UVT 15x24 cm con cinco posiciones	E4B240
Portageles UVT 15x25 cm con cinco posiciones	E4B250
Portapeine	E3P
Cables de corriente (par)	MT1010

#### Peines Opcionales modelo E1

nº diente	grosor (mm)	vol. pocillo (ul) *	ref.:
16/20	1	30/22'5	E3P16201
16/20	1'5	45/34'5	E3P16201
16/20	2	60/45	E3P16202
10/30	1'5	82'5/22'5	E4P10301
25/30	1'5	30/22'5	E3P25301

\* Volúmenes calculados con un gel de 5 mm de

### Modelo E5



Tamaño del gel: 20 cm x 25 cm

El sistema completo incluye:

- Cámara de electroforesis. Dim. externas: 53x26x10 cm
- Portageles UVT 20x25 cm, 5 ó 6 pos. fijas del portapeines (ref.:E5B250)
- Peine 22/27 dientes; 1'5 mm de grosor (ref.:E5P222715)
- Portapeines (ref.: E5P)

#### Accesorios modelo E5

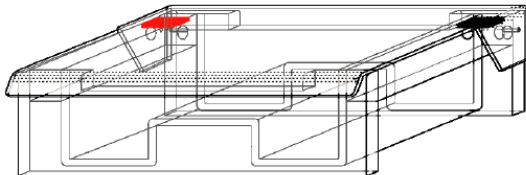
Portageles UVT 22x25 cm con 5/6	E5B250
Portageles UVT 20x40 cm con siete	E5B400
Cables de corriente (par)	MT1010
Portapeine	E1P

#### Peines Opcionales modelo E1

nº diente	grosor (mm)	vol. pocillo (ul) *	ref.:
22/27	1	45/34	E5P22271
22/40	1'5	45/27	E5P224015
22/44	1'5	45/27	E5P224415

\* Volúmenes calculados con un gel de 5 mm de grosor

### Modelo E6



Tamaño del gel: 16'5 cm x 18 cm

El sistema completo incluye:

- Cámara de electroforesis. Dim. externas: 36'5x21'5x10 cm
- Portageles UVT 16'5x18 cm, 3 pos. fijas del portapeines (ref.:E6B180/3)
- Peine 18/36 dientes; 1'5 mm de grosor (ref.:E6P183615)
- Portapeines (ref.: E6P)

#### Accesorios modelo E6

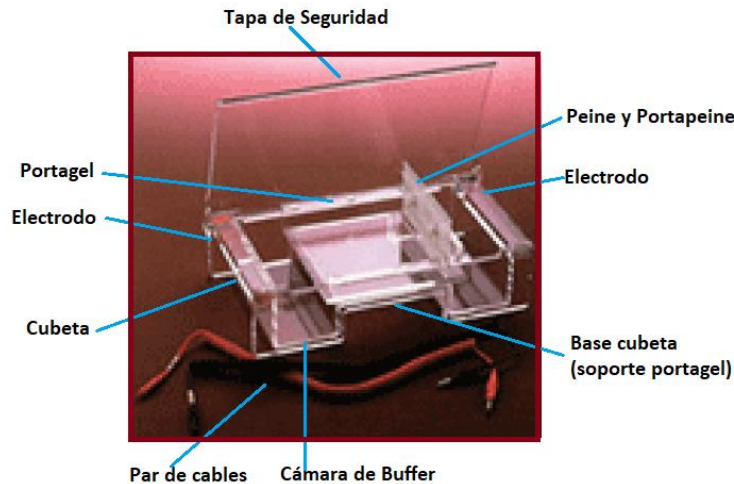
Portageles UVT 16'5x18 cm con tres posiciones	E6B180/3
Portageles UVT 16x18 cm con cuatro pos. fijas	E6B180/4
Portapeine	E6P
Cables de corriente (par)	MT1010

#### Peines Opcionales modelo E6

nº diente	grosor (mm)	vol. pocillo (ul) *	ref.:
18/36	1'5	30/15	E6P183615

\* Volúmenes calculados con un gel de 5 mm de grosor

### Vista General



## Instrucciones de manejo

Antes de la utilización del sistema por primera vez, se recomienda lavar la cubeta, el portagel y los peines y portapeines debidamente con agua destilada, para eliminar cualquier residuo de fabricación.

### Configuración

1. Sin conectar los cables de conexión, levante la tapa de la cubeta para permitir poner o quitar el portagel.
2. Colocar el portagel en una superficie plana. Cerrar con cinta adhesiva los extremos presionando ligeramente para garantizar un perfecto sellado. Comprobar con un nivel de burbuja que está perfectamente horizontal, de esta manera asegurará que el gel se distribuya de manera uniforme en todo el portagel.
3. Al preparar el gel, use agarosa de grado electroforesis y tampón compatible. El gel se puede preparar de varias maneras. El porcentaje de agarosa y el tampón utilizado se determina por el tamaño de las muestras a separar y la recuperación adicional de las muestras. Consulte más adelante la tabla de preparación de agarosa para conocer el tipo y la cantidad de agarosa necesaria (asegúrese de consultar las instrucciones del fabricante para conocer los requisitos específicos para la agarosa que se usa).
4. Pesar la cantidad apropiada de agarosa, y vaciar en un matraz Erlenmeyer. Añadir tampón al matraz. El tampón TBE o TAE son las opciones de tampón más utilizadas para las separaciones de ADN (consulte más adelante formulaciones de tampones). La agarosa y el tampón se mezclan y se calientan, normalmente en un horno microondas hasta que la agarosa se disuelve por completo.

#### ¡ADVERTENCIA!

Para evitar daños en la bandeja portagel, **enfríe siempre la agarosa a 60°C** antes de verterla.

Verter el gel: se recomienda que entre los dientes del peine y la base del portagel quede un espacio entre 1 y 2 mm.; esto evitará la perforación de la base del gel. Los peines se montan previamente en el portapeines gracias a los tornillos roscados de nylon que permiten un fácil ajuste de presión,

Situar y encajar el portapeines en las ranuras correspondientes de la bandeja portagel. Ajustar también la altura del peine si fuese necesario. Se pueden colocar más portapeines con sus peines correspondientes en todas las ranuras dispuestas en el portagel para cargar más muestras.

Al verter tenga cuidado de no crear burbujas a lo largo de los dientes del peine, si es el caso reventar con una pequeña pipeta de vidrio o con el borde de un diente de peine.

Verter la cantidad de solución líquida de agarosa deseada (de 5 a 7 mm de altura de gel es suficiente).

Permita que el gel se solidifique durante 30 minutos. Si se van a utilizar numerosos geles en un día, se puede preparar un gran volumen de gel y colocarlo en una botella tapada y almacenar entre 40-60 ° C en un baño de agua. Esto proporciona un suministro de gel listo en una forma líquida tibia que se solidificará rápidamente cuando se viertan en el portagel.

5. El gel se puede teñir durante o después de la ejecución con una variedad de colorantes para la documentación fotográfica de las muestras. El colorante más común para el ADN es el bromuro de etidio. La solución de bromuro de etidio se puede agregar directamente al gel de agarosa y al tampón de ejecución para visualizar y fotografiar los fragmentos separados después de la ejecución del gel, eliminando la necesidad de un paso de tinción adicional. Para usar este método, agregue una solución de bromuro de etidio al gel (después del calentamiento) y al tampón en funcionamiento en una concentración de 0.5 µl / ml.

#### ¡ADVERTENCIA!

El bromuro de etidio es un mutágeno y puede causar irritación grave de la piel y los ojos. Siempre use guantes al manipular.

### Funcionamiento

1. Una vez que el gel se haya solidificado, retire con cuidado la cinta adhesiva de los extremos abiertos de la agarosa al tampón. Asegúrese de colocar la bandeja de gel en la orientación adecuada; la primera ranura del peine debe estar más cerca del electrodo del cátodo (negro).

2. Vierta suficiente tampón de funcionamiento compatible en la unidad para llenar la cámara y cubrir y sumergir completamente el gel. El nivel de tampón debe cubrir el gel por encima al menos 2-3 mm. Consulte "Descripción general del sistema" para conocer los volúmenes aproximados de buffer necesarios para su unidad. Demasiado poco tampón puede hacer que el gel se seque durante la ejecución, mientras que el exceso de tampón puede retrasar la migración de ADN en el gel.

Retire con cuidado los peines suavemente levantándolos lentamente de la bandeja de gel para evitar daños en los pocillos. Si está utilizando un gel de agarosa de alto porcentaje, es especialmente importante cubrir el gel con tampón antes de intentar quitar el peine.

3. Cargue las muestras preparadas en los pozos. Las muestras deben mezclarse con un volumen apropiado de tampón de carga de muestra 10X (dando peso a las muestras para que caigan de manera uniforme en los pocillos) lo que le permitirá controlar el recorrido del gel.

4. Para cargar muestras, incline la punta de la pipeta en el pozo y lentamente en el pozo. Tenga cuidado de no empujar la punta de la pipeta a través del fondo de la muestra, ya que esto provocará una fuga significativa de muestras de pozo a pozo.

#### **¡ADVERTENCIA!**

NOTA: Es aconsejable correr siempre un carril con un marcador (escalera estándar conocida = ladder) para determinar la concentración y el tamaño de los fragmentos separados después de la ejecución del gel, y para ayudar en la fotodocumentación y análisis.

5. . Cerrar la tapa de la cubeta y conectarla a una fuente de alimentación con los cables que se suministran con el equipo, de acuerdo con el código de colores rojo(positivo)/negro(negativo) establecido que proporciona la polaridad eléctrica correcta. Iniciar el proceso.

Encienda la fuente de alimentación y ajústela al nivel de voltaje apropiado y comience la electroforesis. Las condiciones de funcionamiento recomendadas son 5 voltios / cm de distancia entre electrodos.

**Condiciones óptimas para la electroforesis:** Voltaje recomendado: de 40 a 150 V

Periodos de tiempo sugeridos: 30 minutos para E1, 90 minutos para E3 y de 2 a 6 horas para E4, E5, E6

En general, los voltajes altos hacen migrar las muestras de forma más rápida y a más alta temperatura, mientras que con voltajes bajos migran más lentamente, pero las bandas que se separan son más definidas.

Recuerde que los ácidos nucleicos están cargados negativamente en entornos alcalinos a neutros y, por lo tanto, migrarán del ánodo negativo al ánodo cargado positivamente.

Tenga en cuenta que en geles de 0,5 x TBE, el azul de bromofenol co-migra a 300 pb (pares de bases), y xileno cianol migra a 4 kbp con fragmentos de ADN.

Cuando se completa la carrera; el buffer de carga habrá migrado tan lejos como se desee, o hasta 5 mm a finalizar en el extremo del gel. Una vez finalizada la carrera, presionar el interruptor de PARADA de la fuente de alimentación y apagarla antes de desconectar los cables de conexión de la cubeta.

El portagel transparente al UV con el gel se puede colocar directamente en un transiluminador para la visualización de las bandas. No corte ni lamine el gel directamente sobre el portagel, su superficie puede resultar dañada.

Proceda a la tinción del gel, con solución de bromuro de etidio u otro colorante adecuado para geles de agarosa.

## **6. Precauciones. Uso de Bromuro de Etidio como marcador.**

#### **¡ADVERTENCIA!**

**Importante:** El bromuro de etidio es un mutágeno y puede causar irritación grave de la piel y los ojos. Siempre use guantes al manipular.

Tinción con bromuro de etidio: una vez que se haya completado la electroforesis, prepare 200 ml de solución de tinción. Agregue 10 µl de solución de bromuro de etidio de 10 mg / ml a 200 ml de agua desionizada. Remoje el gel durante 15 minutos con agitación suave y luego elimine las manchas en agua fresca desionizada durante 15 minutos. El gel se puede ver luego usando un transiluminador.

Nota: a causa de la mutanidad debe evitarse estrictamente el contacto con las manos, piel, utilizando guantes adecuados. Para descontaminar la cubeta usar las técnicas apropiadas de laboratorio. Rechazar el gel contaminado en los contenedores legalmente destinados para este material.

### **Limpieza**

Es importante enjuagar el tanque de gel con agua desionizada después de cada uso para mantenerlo limpio. Use un detergente suave para eliminar cualquier residuo. Se recomienda dejar que el tanque se seque al aire en lugar de secarse con una toalla para evitar daños a los cables del electrodo.

#### **¡ADVERTENCIA!**

No use etanol u otros solventes orgánicos para limpiar productos acrílicos. Los solventes orgánicos causan que el acrílico se agriete. Consulte la lista de productos químicos y compuestos de laboratorio y su compatibilidad con el acrílico en el Apéndice.

## Preparación y propiedades de los sistemas tampón TAE y TBE

Estos tampones se usan porque ambos tienen un pH básico que le da al grupo fosfato del ADN una carga negativa neta que permite la migración del ADN hacia el ánodo positivo (rojo) en la unidad de gel. Los tampones de electroforesis suministran los iones necesarios para la electroforesis y establecen un cierto valor de pH en el que la molécula objetivo se adapta a su carga eléctrica requerida. Los ácidos nucleicos, por ejemplo, se cargarán negativamente en un entorno alcalino a neutro. Además, los tampones de electroforesis a menudo contienen reactivos que protegen la molécula objetivo de la degradación (por ejemplo, los complejos de EDTA cationes bivalentes y, por lo tanto, inhiben las DNAsas). Si se desea la electroforesis en condiciones desnaturizantes (como para la electroforesis de ARN), los tampones de electroforesis contendrán adicionalmente reactivos que eliminan la formación de estructuras secundarias.

Abajo encontrará concentraciones para TAE y TBE, dos de los tampones más utilizados para la electroforesis del ADN. Si la intención es la extracción del ADN del gel, se debe elegir el tampón TAE. En comparación con TBE, la migración TAE será más rápida y se logrará una mejor resolución del ADN superenrollado. Sin embargo, debido a la capacidad limitada de protección del TAE ya que se calienta, seleccione TBE cuando realice separaciones de electroforesis largas. Como que la agarosa tiende a crear tamaños de poro más finos y una matriz más sólida en TBE, la dispersión del ADN se reducirá y se logrará un patrón de banda más discreto.

En resumen, El TBE (Tris-borato-EDTA) es un medio conductor mejor que el TAE (Tris-acetato EDTA), por lo que es menos propenso al sobrecalentamiento, así que use TBE para carreras largas, es decir pequeños fragmentos. El borato TBE, es un inhibidor enzimático, por lo que TBE no es un buen tampón para usar si va a extraer ADN para los pasos enzimáticos posteriores. Por ejemplo, la transferencia de borato podría afectar sus ligaciones, así que use TAE en su lugar.

El acetato TAE, proporciona una separación mejorada de grandes fragmentos de ADN.

Por otro lado, el borato resuelve mejor fragmentos de <2kb, así que use TBE para fragmentos más pequeños.

## Concentraciones

### TAE – Tris-Acetato con EDTA (40mM Tris-Base, 40mM Acetic Acid, 1mM EDTA)

50X Stock Solution, pH 8.5	1X Working Solution
242g Tris-Base	40mM Tris Acetate
57.1 ml Glacial Acetic Acid	
100 ml 0.5M EDTA (pH 8.0)	1mM EDTA
Agua Destiladaa to Liter Final Volume	

### TBE – Tris-Borato con EDTA (89mM Tris-Base, 89mM Boric Acid, 1 mM EDTA)

10X Stock Solution	1X Working Solution
108g Tris-Base	89mM Tris-Base
55g Boric Acid	89mM Boric Acid
20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)	1mM EDTA
Distilled Water to 1 Liter Volume	
<b>No requiere ajuste del pH</b>	

## Recomendaciones

### TAE BUFFER

- Utilícelo cuando se recupere el ADN (es decir, mediante geles de agarosa de bajo punto de fusión)
- Uso para electroforesis de fragmentos de ADN grandes ( $\geq 20\text{kb}$ )
- Aplicaciones que requieren alta resolución

### TBE BUFFER

- Buffer de uso general
- Puede ser reutilizado
- Uso para electroforesis de pequeños fragmentos de ADN ( $\leq 2\text{kb}$ )
- Disminución de la movilidad del ADN.
- Alta fuerza iónica y alta capacidad de protección, por lo que es ideal para tanques horizontales sin recirculación de buffer.
- TBE Buffer reacciona con la agarosa haciendo poros más pequeños y una matriz más apretada. Esto reduce la dispersión de las bandas de ADN para obtener resoluciones más nítidas.



## Preparación del gel: Para grosor recomendado de 5mm

El volumen del gel es determinado por la siguiente fórmula:

$$\text{ancho de gel(cm)} \times \text{largo de gel (cm)} \times \text{grosor de gel(mm)} \times 0,1 = \text{ml de agarosa}$$

Ancho de gel (cm)	Largo del gel (cm)	Grosor del gel (mm)	Volumen del Gel (ml)
6,5	10	5	32,5
6,5	8	5	26
15	11	5	82,5
15	12,5	5	93,75
15	18	5	135
15	20	5	150
15	24	5	180
15	25	5	187,5
22	25	5	275
20	40	5	400
16	18	5	144
16,5	18	5	148,5

### Porcentaje de agarosa y separación de fragmentos de ADN.

El rango óptimo de tamaños de fragmentos de ADN separados por cualquier experimento de electroforesis depende de la concentración de agarosa del gel. Cuanto mayor es la concentración de agarosa, mejores fragmentos pequeños se separan entre sí y viceversa. Sin embargo, para los fragmentos más pequeños o más largos, se debe considerar el uso de agarosas especializadas o geles de poliacrilamida (ver la tabla a continuación) ya que una solución de agarosa al 3% se solidifica rápidamente y un gel de agarosa al 0.3% es muy blando y difícil de manejar.

Contenido de Agarosa (w/v)	Agarosa (gr)	Buffer (ml)	Rango de separación óptimo (kb)
0.3 %	0.3	100	5- 30
0.5 %	0.5	100	1- 15
0.7 %	0.7	100	0.8 - 10
1.0 %	1.0	100	0.5- 7
1.2 %	1.2	100	0.3 -6
1.5 %	1.5	100	0.2-4
2.0 %	2.0	100	0.1- 3
3.0 %	3.0	100	≤ 0.1

### En caso de utilizar Bromuro de etidio

Para la documentación fotográfica de las muestras, el gel se puede teñir durante o después de la ejecución con una variedad de colorantes. El colorante más común para el ADN es el bromuro de etidio. El bromuro de etidio se puede agregar directamente al gel y al tampón de ejecución para visualizar y fotografiar los fragmentos separados después de la ejecución del gel sin la necesidad de una etapa de tinción adicional. El bromuro de etidio se agrega tanto al gel (después del calentamiento) como al tampón de electroforesis a una concentración de

0,5 µg / ml. Por el contrario, el gel puede teñirse en una solución concentrada de bromuro de etidio después de que el gel corra y enjuagarse para su visualización.

### ¡ADVERTENCIA!

El bromuro de etidio es un carcinógeno potencial. Se debe tener cuidado al manipular el polvo y la solución. Siempre use guantes al manipular el polvo, las soluciones y todos los geles que contienen bromuro de etidio.

### Buffer o tampón de carga / Buffer de muestra

Las muestras se preparan y se combinan con tampón de carga de gel antes de cargarlas en el gel. Los tampones de muestras generalmente contienen componentes similares al tampón en ejecución, colorantes para visibilidad y glicerol para proporcionar peso a las muestras. Este aumento de la densidad y el color de la muestra permite una fácil visualización de las muestras y garantiza que las muestras se carguen uniformemente en los pocillos y no floten durante la carga. Los tintes también migran hacia el extremo del ánodo de la cámara de electroforesis a velocidades predecibles que permiten monitorear el funcionamiento del gel. En geles de 0,5 x TBE, el **azul de bromofenol** migra a la misma velocidad que los fragmentos de **ADN de 300 pb** (*pares de bases*); y el **xileno cianol** aproximadamente a la misma velocidad que los fragmentos de **ADN de 4 kb** (*kb = kbp = kilopares de bases*). Para fragmentos más pequeños de **ADN de 50 pb** más se utiliza **naranjaG**.

El tampón de carga más utilizado es el glicerol, el azul de bromofenol y el xileno cianol

### **6X tampón de muestra de ADN**

0,25% (p / v) de azul de bromofenol

0.25% (p / v) xileno cianol FF

30% (v / v) de glicerol en agua

### **Marcador de peso molecular**

Los marcadores se ejecutan en cada gel para controlar la calidad de la separación de la muestra y permitir una estimación del tamaño de bandas específicas. Al ejecutar un marcador conocido de una concentración específica en paralelo, se puede estimar la cantidad de ADN de las muestras desconocidas.

### **Consejos técnicos**

#### Correr un marcador (escalera ó ladder)

Se recomienda correr siempre una carrera de muestra de un (ladder) "marcador" conocido para determinar la concentración y el tamaño de los fragmentos separados después de la ejecución del gel, y para ayudar en la documentación y el análisis fotográfico.

#### Cargando muestras

A veces es más fácil cargar los pocillos de muestra en seco antes de sumergir el gel en la cubeta con el buffer. Después de que el gel se solidifique, en caso de estar dentro de la cubeta, retire el conjunto portagel y gel y colóquelo en el banco de laboratorio. Retire con cuidado los peines del gel, levantando suavemente hacia arriba. Las muestras mezcladas con tampón de carga que no contiene colorante pueden ser más fáciles de cargar en seco, especialmente en unidades de gel más grandes para evitar la contaminación cruzada. Después de cargar todos los carriles con la muestra, coloque el portagel con el gel en la cubeta habiendo retirado la cinta adhesiva con cuidado, y rellene lentamente la cámara con el buffer no superando en 2-3mm la altura del gel.

#### Opciones del peine

Los peines son resistentes y fabricados de una sola pieza en nylon. Los pocillos de muestra resultantes están preestablecidos para obtener consistencia y precisión. Según el modelo de cubeta tiene opciones de 1, 2 y 1.5 mm de espesor.

#### Formato de microtiter

Los peines con formato de microtiter están diseñados para usarse con pipetas multicanal que se cargan desde una placa multicanal de 96 pocillos. La pipeta multicanal está configurada de modo que las puntas de la pipeta estén separadas 9 mm. Un investigador puede tomar 4, 8 o 12 muestras simultáneamente de la placa. Cuando la distancia entre el centro de un diente y el centro del siguiente es de 9 mm, el peine es un peine 1X, cuando la distancia es de 4.5 mm, el peine es 2X.

## RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	SOLUCIÓN
Los peines se dañan al quitarlos del gel	Asegúrese siempre que el gel se solidifique por completo antes de quitar el peine. Mueva suavemente el peine hacia adelante y hacia atrás ligeramente para aflojarlo el balanceo ayuda a evitar la succión mientras se retira el peine. Si se vierte gel de agarosa de alto porcentaje, puede ser difícil quitar el peine, Coloque el portagel en la cubeta y agregue el tampón antes de quitar el peine
Las muestras aparecen difusas en el gel	Se debe permitir que los geles se solidifiquen por completo. Para agarosa estándar - 30 minutos.  Si se usa agarosa de bajo punto de fusión, puede ser necesario solidificar completamente, gelifica a una temperatura más fresca en el refrigerador o en la cámara fría.  Los geles deben sumergirse en 2-3 mm de tampón para evitar que el gel se seque, pero El exceso de tampón $\geq 5$ mm puede causar disminución de la movilidad del ADN y distorsión de la banda.
Las bandas no están bien definidas, limpias.	Siga siempre el procedimiento adecuado para preparar la agarosa de acuerdo con Las instrucciones del fabricante. Al preparar la agarosa, asegúrese de que todo el polvo de agarosa esté en solución antes de calentar Agite de vez en cuando mientras calienta para derretir y mezclar completamente.
Gel sonrisa o smile	El gel puede ser desigual. Asegúrese de verter el gel en una superficie nivelada El voltaje puede ser demasiado alto, ajuste de voltaje más bajo en la fuente de alimentación, vea las instrucciones
No hay migración	No hay conexión eléctrica en contacto con el gel. Asegúrese de que todos los contactos son firmes entre la fuente de alimentación y la cubeta de electroforesis. Verifique la preparación del tampón para asegurarse de que se preparó de forma adecuada Verifique la integridad de los electrodos para asegurarse de que no se haya producido una rotura. Cualquier ruptura en el electrodo causará una migración lenta o ninguna. Para probar la unidad, llene el tanque con tampón en funcionamiento y conéctelo a la fuente de alimentación sin la bandeja de gel en el tanque. . Los electrodos de hilo de platino producirán pequeñas burbujas a medida que la corriente pase Un exceso de tensión puede provocar un exceso de burbujas.
Migración lenta	Verifique la preparación del tampón para asegurarse de que se preparó el tampón con fuerza iónica adecuada. Voltaje demasiado bajo, aumentar el voltaje, ver instrucciones Verifique la integridad de los electrodos para asegurarse de que no se haya producido una rotura. Cualquier ruptura en el electrodo causará una migración lenta o ninguna.
El gel corre lento Con parámetros normales	El volumen de tampón en funcionamiento utilizado para sumergir el gel solo debe ser de 2-3 mm sobre la superficie del gel. El gel debe estar completamente sumergido para evitar secarse, ya que puede manchar las bandas y posiblemente derretir el gel debido al sobrecalentamiento Si se agrega un tampón excesivo, la movilidad del ADN disminuye y puede producirse una distorsión de la banda
Excesivo calor	La fuerza iónica del tampón es demasiado alta. Verifique la preparación del tampón para asegurarse que se preparó un tampón de fuerza iónica adecuada. El voltaje puede ser demasiado alto, ajuste de voltaje más bajo en la fuente de alimentación, consulte las instrucciones.
Un lado del gel corre despacio	El gel puede ser desigual. Asegúrese de verter el gel en una superficie nivelada. Verifique la integridad de los electrodos para asegurarse de que no se haya producido una rotura. Cualquier ruptura en el electrodo causará una migración lenta o ninguna.
Ninguna banda visible	Si la orientación es defectuosa, o se invierte la polaridad, las muestras migrarán. Si se usó un marcador de ADN y está presente en el gel, verifique la integridad de la muestra Acortar el tiempo de ejecución. El gel debe detenerse cuando el buffer de carga haya migrado quedando aprox 5 mm para el final del gel.

### Recursos adicionales

#### Wikipedia

<https://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis>

[https://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis\\_en\\_gel](https://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis_en_gel)

[https://ca.wikipedia.org/wiki/Electroforesi\\_en\\_gel\\_d%27agarosa](https://ca.wikipedia.org/wiki/Electroforesi_en_gel_d%27agarosa)

## Compatibilidad química del metacrilato (acrílico, PMMA)

Este cuadro se suministra para su interés. El acrílico es compatible con la mayoría de los solventes y soluciones que se encuentran en el laboratorio bioquímico. Sin embargo, algunos solventes pueden causar daños sustanciales. Mantenga este cuadro a mano para evitar daños a su unidad.

Esta lista no incluye todas las posibles incompatibilidades químicas y compuestos seguros. Los productos de Ecogen deben limpiarse con un detergente suave y agua tibia. Además, los productos de eliminación de RNAsa también son seguros para el acrílico.

### Compatibilidad química para productos a base de acrílico, códigos:

**S** - Seguro (sin efecto, excepto posiblemente algunas manchas)

**A** - Atacado (ligero ataque o absorción del líquido; leve agrietamiento o hinchazón, pero el acrílico ha conservado la mayor parte de su resistencia)

**I** - Insatisfactorio (ablandado, hinchado, disuelto lentamente)

**D** - Disuelto (en siete días o menos)

Químico	Cód.	Químico	Cód.
Acetic Acid (5%)	S	Acetic Anhydride	A
Ammonia	S	Diethyl Phthalate	A
Ammonium Chloride (saturated)	S	Ethyl Alcohol (50%)	A
Ammonium Hydroxide (10%)	S	Isopropyl Alcohol (100%)	A
Ammonium Hydroxide concentrate	S	Methyl Alcohol (50%)	A
Calcium Chloride (saturated)	S	Nitric Acid (40%)	A
Citric Acid (10%)	S		
Cottonseed Oil (edible)	S	Carbon Tetrachloride	I
Detergent Solution (Heavy Duty)	S	Chromic Acid (40%)	I
Diesel Oil	S	Diethyl Ether	I
2-Ethylhexyl Sebacate	S	Dimethyl Formamide	I
Ethylene Glycol	S	Ethyl Alcohol (95%)	I
Formaldehyde (40%)	S	Hydrofluoric Acid (40%)	I
Gasoline, regular, leaded	S	Hydrogen peroxide (28% solution)	I
Glycerine Heptane (commercial grade)	S	Methyl Alcohol (100%)	I
Hexane	S	Methyl Ethyl Ketone	I
Hydrochloric Acid (10%)	S	Nitric Acid concentrate	I
Hydrochloric Acid concentrate	S	Phenol 5% solution	I
Hydrogen peroxide (3% solution)	S	Sulfuric Acid concentrate	I
Hydroxide (10%)	S		
Isooctane	S		
Kerosene (no. 2 fuel oil)	S	Acetone	D
Mineral Oil (white)	S	Aniline	D
Naptha	S	Benzene	D
Nitric Acid (10%)	S	Butyl Acetate	D
Oleic Acid	S	Chloroform	D
Olive Oil	S	Ethyl Acetate	D
Soap Solution (Ivory)	S	Ethylene Dichloride	D
Sodium Carbonate (2%)	S	Lacquer Thinner	D
Sodium Carbonate (20%)	S	Methylene Chloride	D
Sodium Chloride (10%)	S	Toluene	D
Sodium Hydrochlorite (5%)	S	Trichloroethylene	D
Sodium Hydroxide (1%)	S	Xylene	D
Sodium Hydroxide (10%)	S		
Sodium Hydroxide (60%)	S		
Sulfuric Acid (3%)	S		
Sulfuric Acid (30%)	S		
Turpentine	S		
Water (distilled)	S		

