



REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS

1. Alicuotas Marcadores MW SDS-PAGE

- Colocar varios eppendorf de 0.5 ml en una caja con hielo, y rotular convenientemente (importante poner el tamaño de la alícuota, 3 microlitros). Sumergirlos parcialmente en el hielo.
- Tomar del congelador del laboratorio 102, el tubo con los marcadores (es un tubo con tapa verde y etiqueta amarilla, llamado Biorad SDS PAGE Standard Broad Range). Es muy importante que sea "BROAD RANGE", para estar seguros de qué marcador estamos usando, Cat. nº 161-0317. El tubo está en el cajón rotulado como "Biología Molecular común", en la caja rotulada como "Caja reserva PCR y Marcadores"
- Repartir 3 microlitros en cada eppendorf.
- Depositar las alícuotas en la caja rotulada como "Caja en uso MPM de electroforesis y en agarosa y acrilamida" (que está en mismo cajón que los marcadores).

NOTA: si has consumido la totalidad (o prácticamente la totalidad) del tubo de la etiqueta amarilla, anota sus datos en la hoja de pedidos y comunícalo al responsable de los pedidos.

2. APS 10%

Ojo!: el APS se degrada a temperatura ambiente. Enfriar el agua Milli-Q antes de solubilizar el APS y trabajar rápido. Mantener la muestra a 4°C antes de congelar a -20°C.

Se pesa 1 g de persulfato amónico (ACS grade de Amresco), que estará conservado en nevera en la caja de reactivos para electroforesis, y se lleva a 10 ml de agua Milli-Q. Se disuelve bien, se filtra y se hacen alícuotas de 200 µl, se rotulan y congelan a -20°C.

3. Azul de Coomassie

Reactivos:

- 450 ml etanol al 96% de granel (lo encontraréis debajo de la pila de fregar del lab102)
- 50 ml ácido acético glacial, Manuel Riesgo S.A. (lo encontraréis debajo del armario de electroforesis del laboratorio 102)
- 2.5 g de Azul de Coomassie (Fluka 27816)
- 500 ml de agua destilada

Preparación:

- Mezclar agua, ácido acético y etanol. Medir con probeta
- Añadir el azul de coomassie y mezclar bien. Agitar durante toda la noche para que el tinte se disuelva bien.
- Filtrar
- Guardar en bote ámbar y evitar exposición a la luz.



4. Desteñidor de geles

- Medir en una probeta 1100 ml de agua destilada y transvasar al recipiente de 2 L etiquetado como “desteñidor de geles”.
- Medir en una probeta 800 ml de etanol, de la garrafa de etanol a granel que se encuentra debajo del fregadero del lab.102 y transvasar al recipiente de 2 L etiquetado como “desteñidor de geles”.
- Medir en una probeta 100 ml de ácido acético, que se encuentra en el armario de debajo del cuarto de electroforesis y transvasar al recipiente de 2 L etiquetado como “desteñidor de geles”.
- Homogeneizar la mezcla, cerrando el recipiente e invirtiéndolo un par de veces.

5. Electrolito 10x

Se prepara en botellas de 1 L etiquetadas.

- Pesar 30 g de Tris-(hydroxymethyl)-aminiomethane (Scharlau, TR04231000), que está en la balda de reactivos del lab.102, y colocar en un vaso de precipitados.
- Pesar 144 g de Glicina (Panreac, 141340), que se encuentra en la balda de reactivos del lab.102, y añadir sobre mismo vaso de precipitados anterior.
- Añadir agua Milli-Q hasta un volumen final de 800 ml aprox. Colocar un imán y agitar hasta completa disolución. Tarda algunos minutos en disolverse.
- Medir un volumen de 100 ml de SDS 10%, que se encuentra con los reactivos SDS-PAGE, en el cuarto de electroforesis, en una probeta que se encuentra etiquetada para ese fin. Considerar sólo el volumen de la solución, no la espuma.
- Cuando todo el sólido se haya disuelto, añadir los 100 ml de SDS 10% al vaso de precipitado en agitación y agitar unos minutos más.
- Transvasar a una probeta de 1 L y enrasar con agua Milli-Q.
- Transvasar de nuevo a la botella de 1 L etiquetada como “electrolito 10x” y colocar en el cuarto de electroforesis, en la balda de reactivos SDS-PAGE.

6. 1 L SDS 10%

Se prepara en botellas de plástico de 1 L, etiquetadas.

- Pesar 100 g de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (Sigma Aldrich, Cat nº:71729-1Kg), que está en la balda de reactivos del lab.102, y colocar en un vaso de precipitados. OJO AL PESAR: EL PRODUCTO, PUES ES NOCIVO, ESPECIALMENTE PARA LAS VÍAS RESPIRATORIAS. POR LO TANTO, HAY QUE PESARLO EN LA CAMPANA SITUADA EN EL LABORATORIO. SI HAY DUDAS DE CÓMO PROCEDER, PREGUNTAR A LOS COMPAÑEROS.
- Añadir agua Milli-Q hasta un volumen de 600 ml aprox. Colocar un imán y agitar (no muy fuertemente, o se generará demasiada espuma) hasta completa disolución. Tarda algunos minutos en disolverse y puede calentarse ligeramente.



- Transferir a una probeta de 1 L que se encuentra con los reactivos SDS-PAGE en el cuarto de electroforesis, etiquetada para ese fin. (NO USAR OTRA!!!).
- Considerando sólo el volumen de la solución, y no la espuma, se enrasa hasta 1 L con agua Milli-Q (EL VOLUMEN FINAL DEBE SER 1 L!!!)
- Transvasar de nuevo a la botella de 1 L, etiquetada como "SDS-10%" (botella de plástico) y colocar en el cuarto de electroforesis, en la balda de reactivos SDS-PAGE.

Consideraciones adicionales

- Lavar a conciencia el vaso de precipitados en donde se haya preparado el SDS. Las proteínas y el SDS son enemigos mortales!
- No es necesario filtrar.

7. Solución TRIS pH 8.8 1,5 M

Reactivos:

- Tris(hidroximetil)aminometano, fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ (Scharlau). Peso molecular 121,14 g/mol
- HCl
- Agua Milli-Q

Procedimiento para preparar 100 ml de solución

- Pesar 18,17 g de Tris base
- Disolver en aproximadamente 80 ml de H₂O Milli-Q
- Ajustar a pH 8,8 agregando HCl concentrado
- Dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente antes de realizar el ajuste final del pH de la solución
- Ajustar el volumen de la solución a 100 ml con agua Milli-Q en una probeta.
- Filtrar la solución antes de guardar

Nota:

El pH de la solución de Tris es dependiente de la temperatura, y disminuye aprox. 0.03 unidades de pH por cada grado centígrado de incremento de temperatura.



8. Solución TRIS pH 6.8 0,5 M

Reactivos:

- Tris(hidroximetil)aminometano, fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ (Scharlau). Peso molecular 121,14 g/mol
- HCl
- Agua Milli-Q

Procedimiento para preparar 100 ml de solución:

- Pesar 6,06 g de Tris base
- Disolver en aproximadamente 80 ml de H₂O Milli-Q
- Ajustar a pH 6,8 agregando HCl concentrado
- Dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente antes de realizar el ajuste final del pH de la solución
- Ajustar el volumen de la solución a 100 mL con agua destilada
- Filtrar la solución antes de guardar

Nota:

El pH de la solución de Tris es dependiente de la temperatura, y disminuye aprox. 0.03 unidades de pH por cada grado centígrado de incremento de temperatura.

9. Tampón de Muestra

- Solución A:
 - 121 mg de Tris [Scharlau, TR04231000]
 - 87.7 mg de EDTA [Sigma Aldrich, E1644-250G]
 - 2 g de SDS [12409090]
 - Llevar a 100 ml con H₂O Milli-Q
- Solución B:
 - 0.4 g Coomassie [R250608002]
 - 50 ml Glicerol [Panreac, E-08211]
 - 50 ml H₂O Milli-Q
- Mezclar 1 ml de Solución A con 0.3 ml de Solución B.