



BIOLOGIE

CELULARA SI MOLECULARA

LP09. Electroforeza



Biologie Celulara si Moleculara

Modul Biologie celulara:

Notiuni microscopie

Evaluare organite celulare;

Culturi de celule;

Modul Biologie moleculara:

Izolarea ADN și ARN;

Amplificarea ADN/ARN

Electroforeza

Tehnici de detectare a mutațiilor:

ASO.

RFLP.

DGGE.

Real-Time PCR.

Secvențiere.

ADN și ARN non-self.

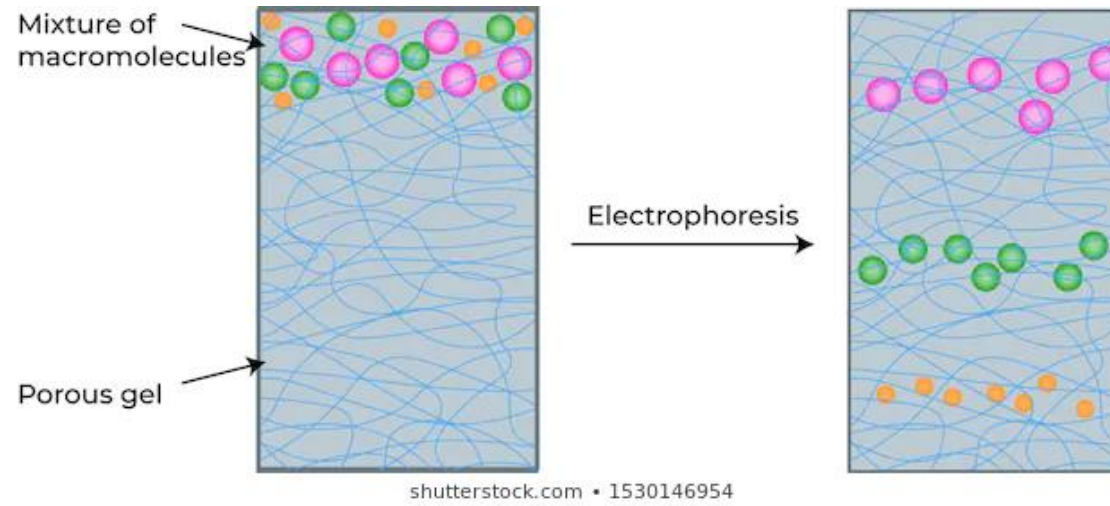
Electroforeza.



Electroforeza

- Termenul “electroforeză” descrie migrarea într-un câmp electric a particulelor ionizate.
- Electroforeza reprezintă una dintre metodele cele mai utilizate pentru **separarea, identificarea și purificarea** acizilor nucleici.
- Nucleotidele, acizii nucleici, proteinele, etc. posedă grupări ionizabile care sunt încărcate negativ la pH alcalin și în consecință migrează către anod (+).

Electroforeza



Electroforeza

agaroză

in camp pulsatil (PFGE)

poliacrilamida (PAAG)

capilara

- Electroforeza în gel de agaroză are o putere de rezoluție/separare mai mică în comparație cu PAAG, dar poate separa fragmente ADN dintr-un domeniu mai larg.
- Variind concentrația de agaroză se pot separa fragmente de lungimi între 20bp până la 50kb.
- Puterea de separare este între 0.1-5kb diferența între fragmente. Concentrația gelului se alege în funcție de lungimea și diferența de lungime între fragmentele vizate.
- Acest tip de electroforeză se realizează în plan orizontal, gelul fiind imersat în soluția tampon.

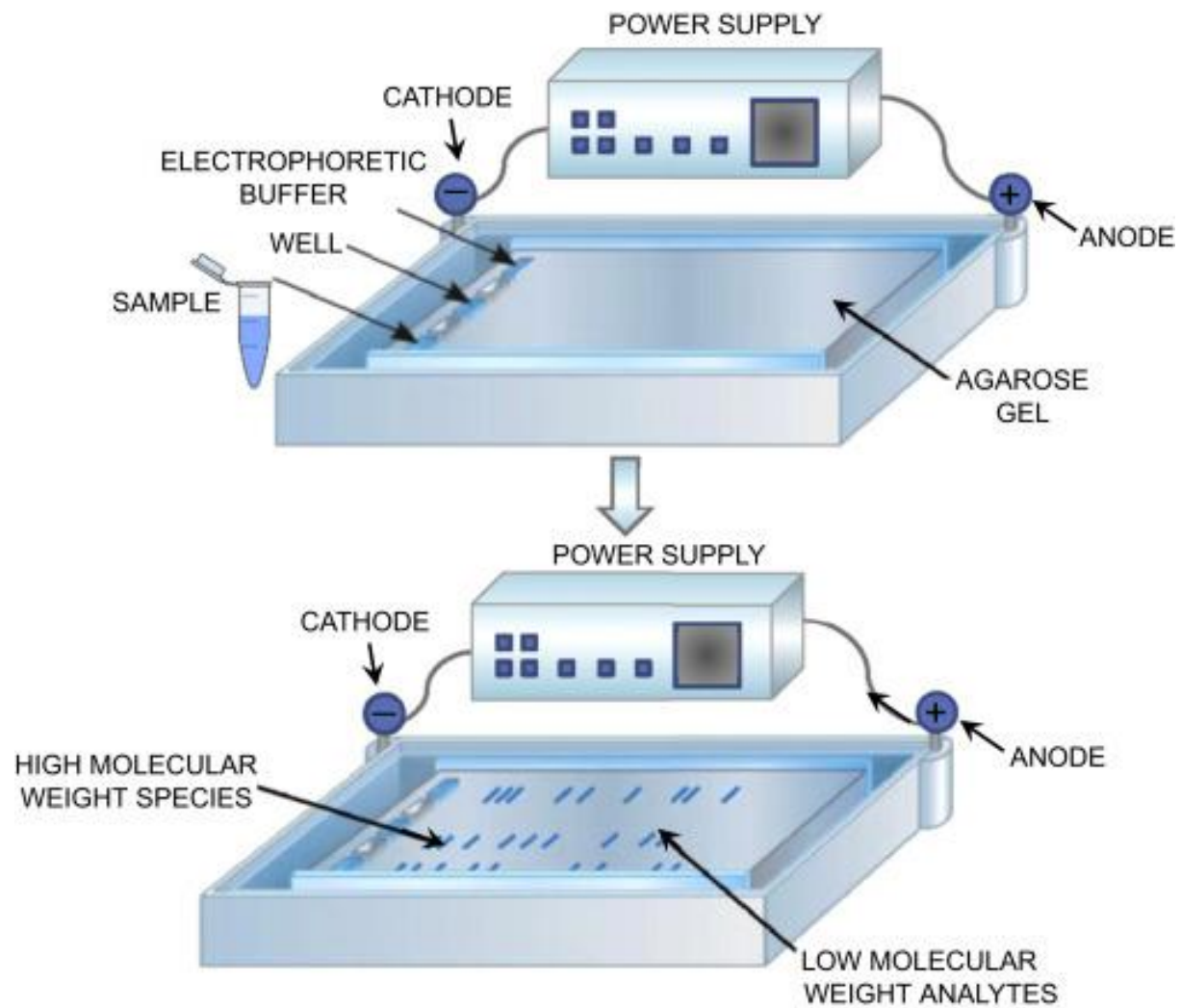
Electroforeza

agaroză

in camp pulsatil (PFGE)

poliacrilamida (PAAG)

capilara



Electroforeza

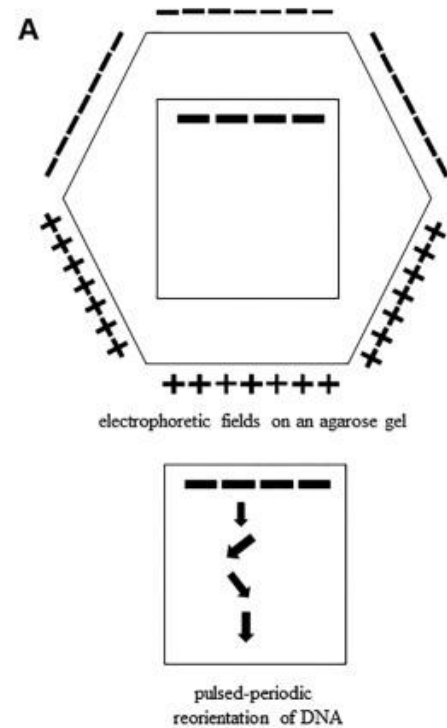
agaroză

in camp pulsatil (PFGE)

poliacrilamida

capilara

- Fragmentele ADN având până la 10000 kb pot fi separate printr-o tehnică electroforetică în care direcția câmpului electric este modificată periodic (Pulse-Field Gel Electrophoresis - PFGE).



Electroforeza

agaroză

in camp pulsatil (PFGE)

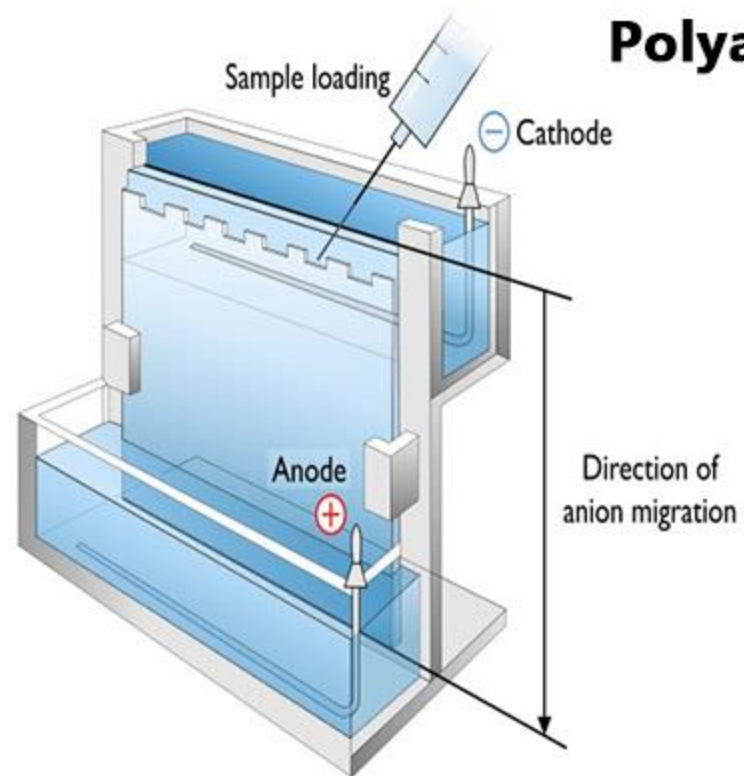
poliacrilamida (PAAG)

capilara

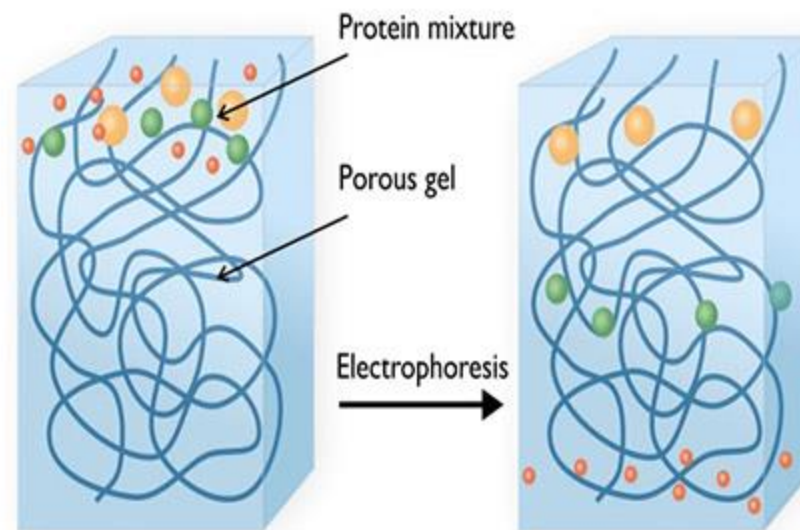
- Electroforeza în gel de poliacrilamidă este foarte eficientă în separarea fragmentelor de ADN de lungime între 3-500bp.
- Puterea de separare este extrem de mare putând fi separate fragmente ADN ce diferă în dimensiune de pana la 1 singură bază.
- PAAG se realizează în plan vertical, într-un câmp electric constant.

Electroforeza

agaroză
in camp pulsatil (PFGE)
poliacrilamida (PAAG)
capilara



Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)





Electroforeza

agaroză

in camp pulsatil (PFGE)

poliacrilamida (PAAG)

capilara

- Electroforeza capilara este foarte eficientă în separarea fragmentelor scurte de ADN cu diferente de 1bp.
- Electroforeza capilara este efectuata de analizoare genetice, in polimer in tuburi subtiri numite capilare. Tehnica aceasta de separare este folosita in secvențiere, MLPA, QF-PCR etc.

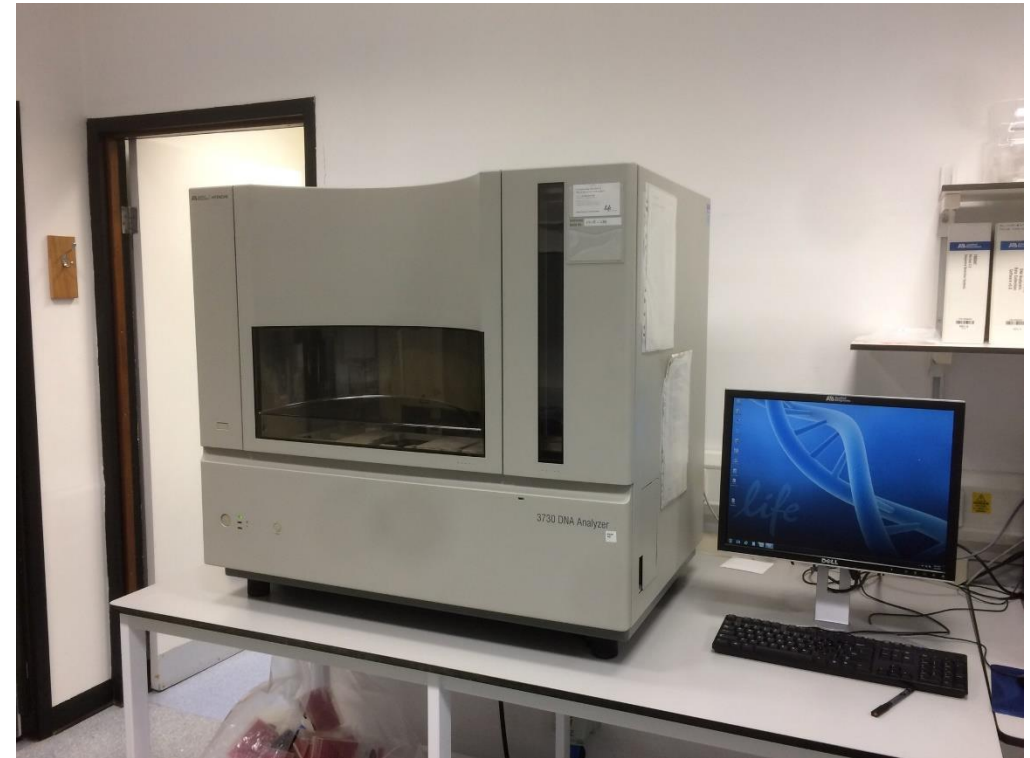
Electroforeza

agaroză

in camp pulsatil (PFGE)

poliacrilamida (PAAG)

capilara





Electroforeza ADN în gel de agaroză

- este o metodă simplă și rapidă;
- dacă este necesar, ADN-ul ce formează benzile poate fi recuperat din gel și analizat suplimentar prin alte metode (clonare, amplificare, secvențiere, etc.).
- permite vizualizarea directă a fragmentelor ADN folosind un colorant intercalar (etidium bromid);

Electroforeza

sarcina electrică și dimensiunea
moleculii;

concentrația gelului;

compoziția soluției tampon;

substanțe adăugate (ex. coloranți
intercalari):

puterea aplicată;

Viteza de migrare este dependentă de:

- sarcina electrică și dimensiunea moleculii;
- concentrația gelului;
- compoziția soluției tampon;
- substanțe adăugate (ex. coloranți intercalari):
- puterea aplicată;

Electroforeza ADN în gel de agaroză

sarcina electrică și dimensiunea moleculei;

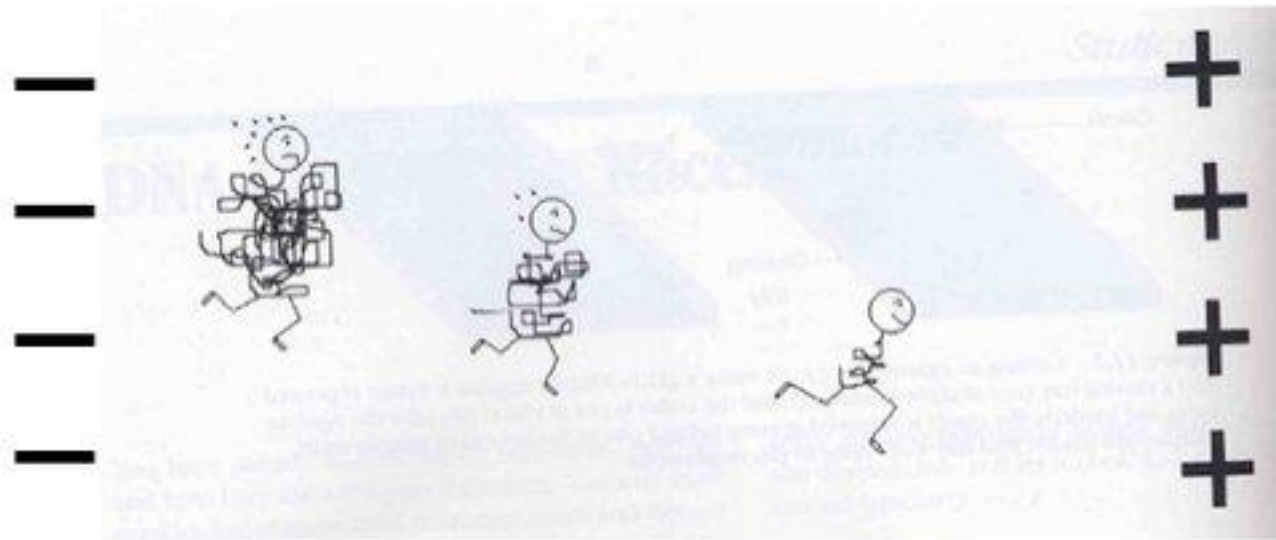
concentrația gelului;

compoziția soluției tampon;

substanțe adăugate (ex. coloranți intercalari):

puterea aplicată;

- În momentul în care gelul este străbătut de un câmp electric ADN-ul (încărcat negativ la pH neutru) migrează către anod.
- Viteza migrării fragmentelor ADN este invers proporțională cu dimensiunea lor.



Electroforeza ADN în gel de agaroză

sarcina electrică și dimensiunea moleculei;

concentrația gelului;

compoziția soluției tampon;

substanțe adăugate (ex. coloranți intercalari):

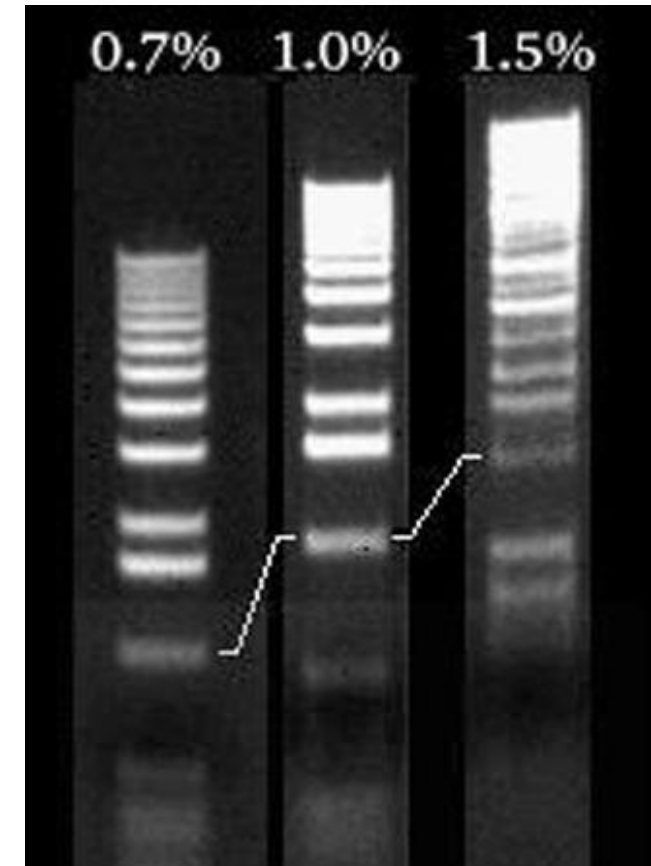
puterea aplicată;

- Agaroză este un polizaharid liniar extras dintr-o algă. Gelul este obținut prin dizolvarea agarozei la o temperatură constantă într-o soluție tampon până când se obține o soluție transparentă.
- Amestecul rezultat este apoi transferat într-o matriță unde agaroză va polimeriza. Se va forma astfel un matrix a cărui densitate este determinată de concentrația agarozei.

Electroforeza ADN în gel de agaroză

sarcina electrică și dimensiunea
 moleculei;
 concentrația gelului;
 compoziția soluției tampon;
 substanțe adăugate (ex. coloranți
 intercalari);
 puterea aplicată;

(%) agaroză în gel	Limitele de separare eficientă a moleculelor liniare de ADN (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2



Puterea de rezoluție a gelului de agaroză de concentrații diferite

Electroforeza ADN în gel de agaroză

sarcina electrică și dimensiunea moleculei;

concentrația gelului;

compoziția soluției tampon;

substanțe adăugate (ex. coloranți intercalari):

puterea aplicată;

- Mobilitatea electroforetică a ADN-ului este afectată de compoziția și tăria ionică a tamponului. Când concentrația soluției tampon/ion este foarte scăzută conductanța electrică este minimă iar ADN-ul migrează foarte încet.
- Sunt disponibile câteva tipuri de soluții tampon pentru electroforeza ADN. Cel mai folosit este Tris-Acetat (TAE) însă datorită capacității sale de tamponare mai degrabă scăzute tinde să fie epuizat în timpul electroforezelor prelungite.
- Atât Tris-Fosfatul (TPE) cât și Tris-Boratul (TBE) sunt mai costisitoare decât TAE dar au o capacitate de tamponare semnificativ crescută.



Electroforeza ADN în gel de agaroză

Exemplu de solutii tampon

Solutie tampon

Soluție de lucru

Soluție stoc concentrate (/litru)

Tris-acetate
(TAE) pH 8.0

1x :
0.04 M Tris-acetate
0.001 M EDTA

50x :
241 g bază Tris
57.1 ml acid acetic glacial
100 ml 0.5M EDTA

Tris-phosphate
(TPE) pH 8.0

1x :
0.09 M Tris-phosphate
0.002 M EDTA

10x :
108 g bază Tris
15.5 ml 85% acid
fosforic (1.679 g/ml)
40 ml 0.5M EDTA

Tris-borate
(TBE) pH 8.0

0.5x :
0.045 M Tris-borate
0.001 M EDTA

5x :
54 g bază Tris
27.5 g acid boric
20 ml 0.5M EDTA

Electroforeza ADN în gel de agaroză

sarcina electrică și dimensiunea moleculei;

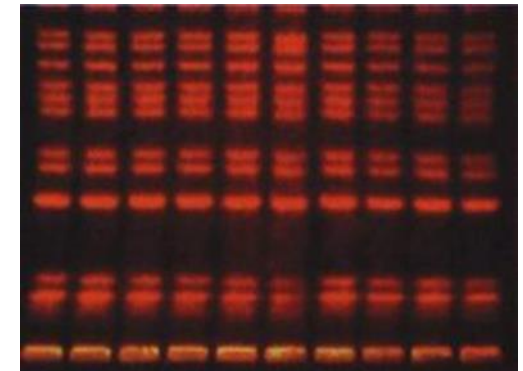
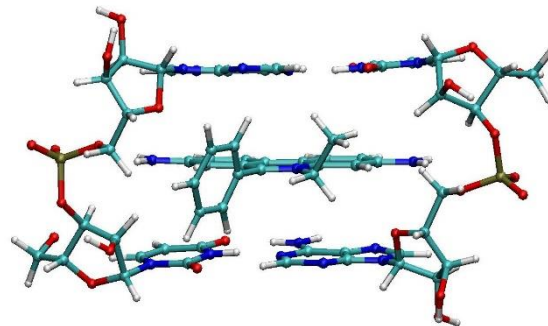
concentrația gelului;

compoziția soluției tampon;

substanțe adăugate (ex. coloranți intercalari):

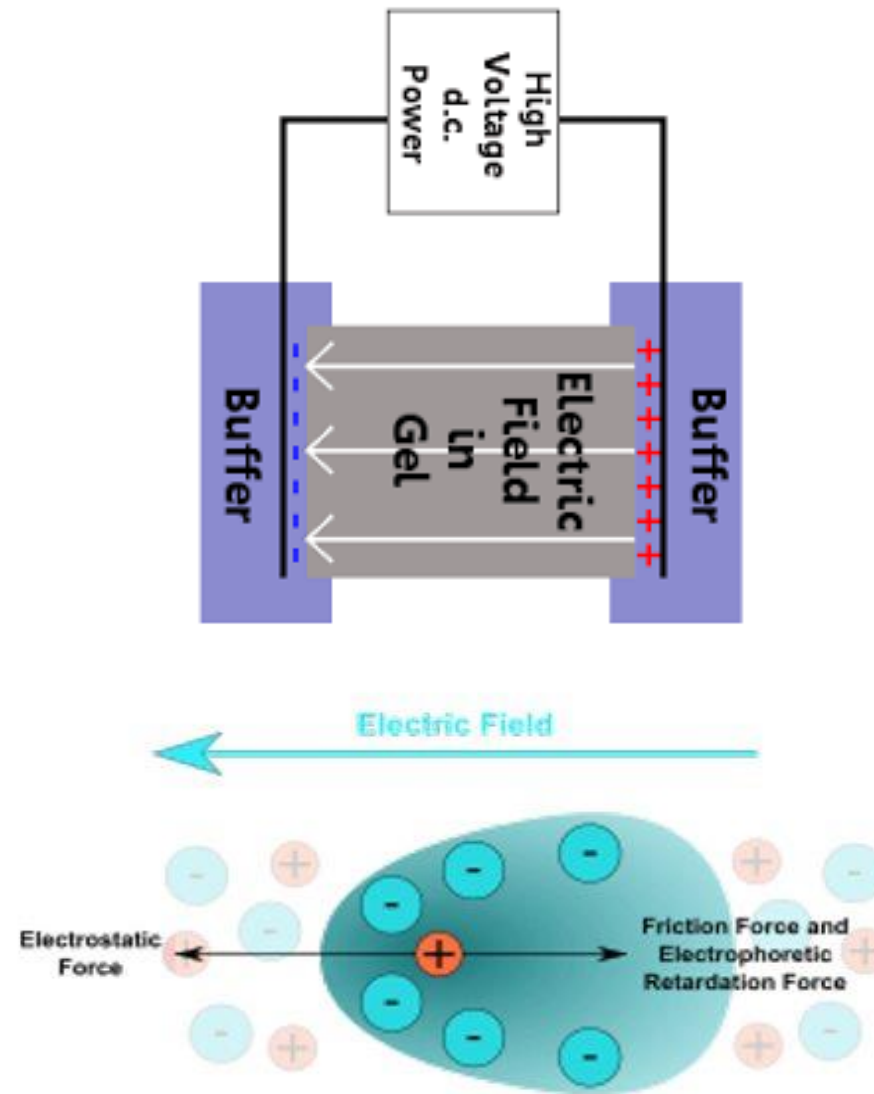
puterea aplicată;

- Etidium bromid este un colorant fluorescent folosit pentru a detecta ADN-ul în agaroză. Colorantul se insinuează între perechile de baze blocate, extinzând lungimea moleculelor liniare de ADN
- Acesta reduce mobilitatea electroforetică a ADN-ului cu aproximativ 15%.
- **Atenție!** Etidium bromid este cancerigen și trebuie manipulat cu grijă.



Electroforeza ADN în gel de agaroză

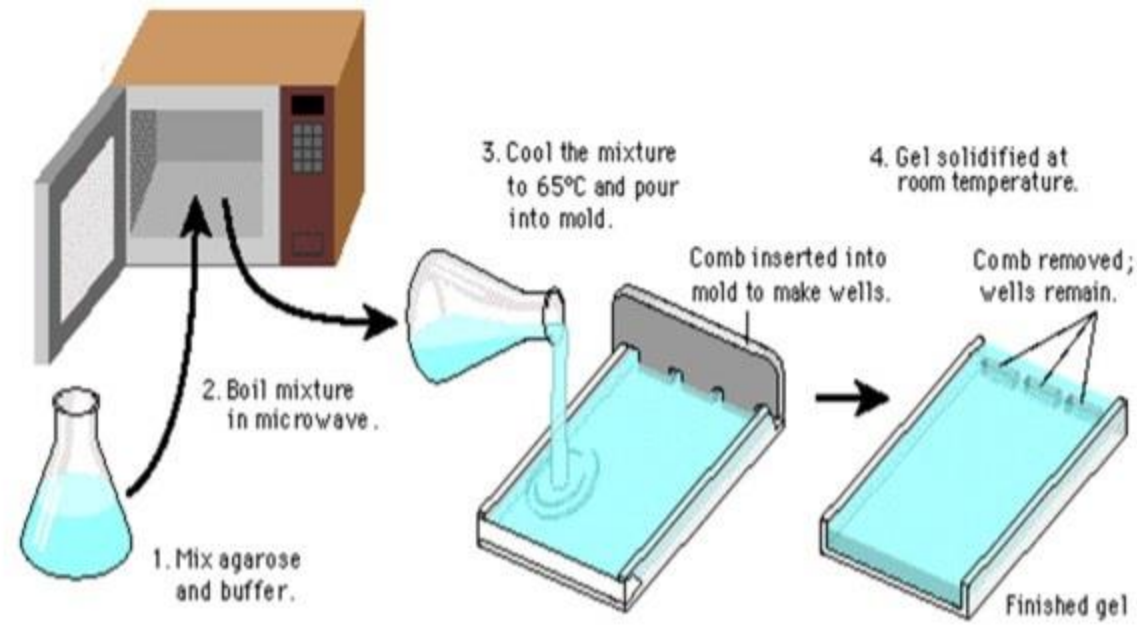
- sarcina electrică și dimensiunea moleculei;
- concentrația gelului;
- compoziția soluției tampon;
- substanțe adăugate (ex. coloranți intercalari);
- puterea aplicată;



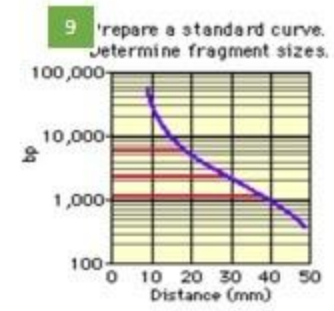
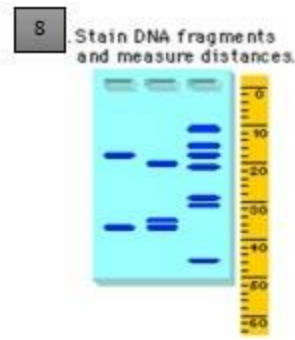
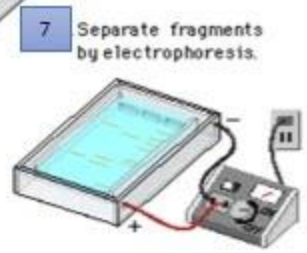
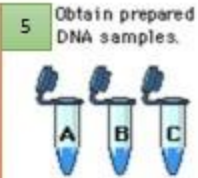
Prepararea gelului de agaroză

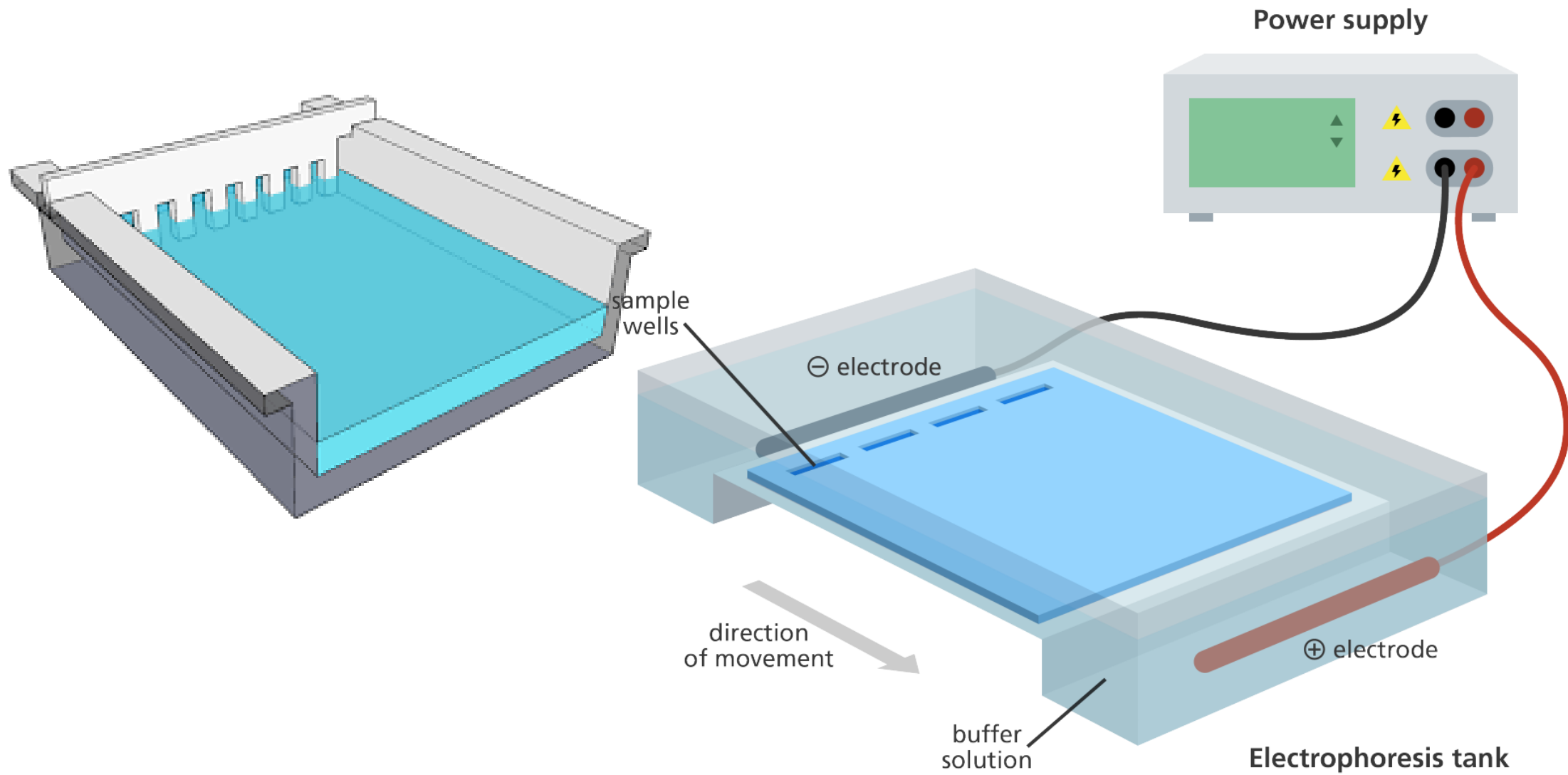
Tehnica de lucru

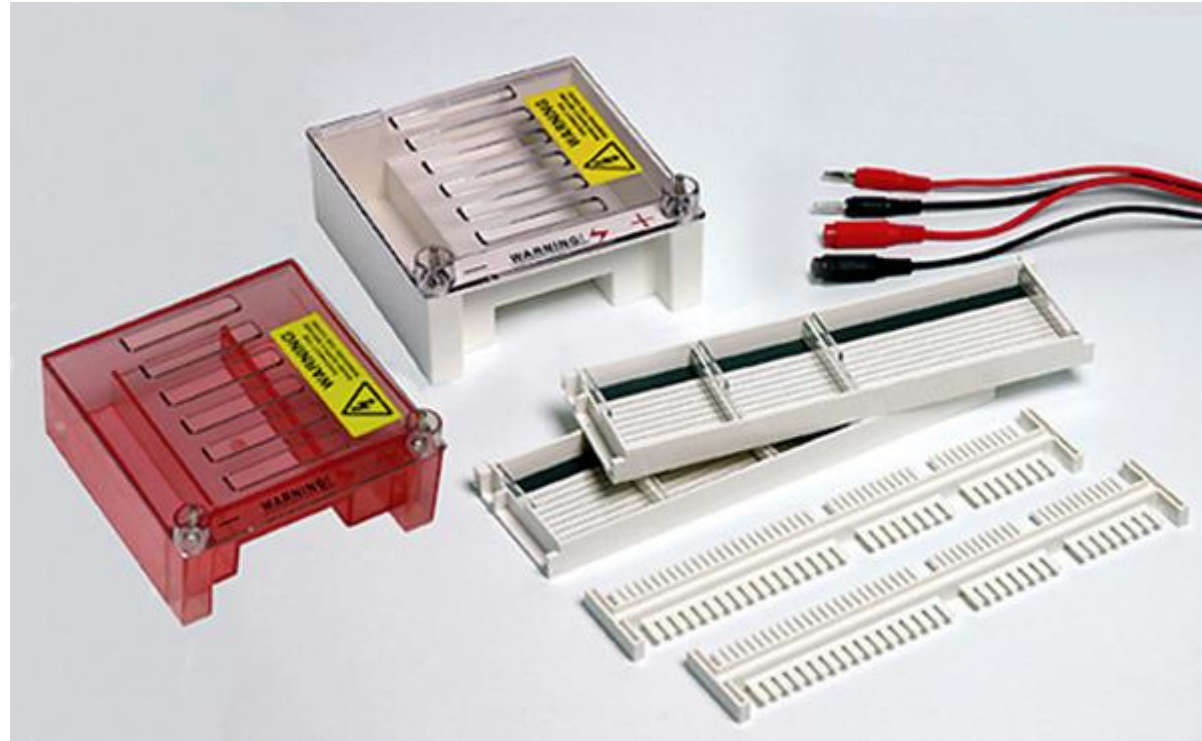
1. Se prepară gelul de agaroză 1% prin adăugarea a 1,0 g de agaroză la 100 ml de tampon TAE 1X. Se marchează nivelul lichidului pe vas și apoi se dizolvă agaroză. Se completează până la semn cu apă distilată preîncălzită la 60°C pentru a înlocui volumul evaporat prin încălzire.
2. Se răcește agaroză până la 55°C și se toarnă pe placa de electroforeză. Placa trebuie să fie dispusă perfect orizontal. După turnare se inseră pieptenele și se lasă la răcit 20-30 minute.
3. Se prepară probele prin amestecarea a 10 μ l din fiecare probă cu 2,5 μ l soluție de aplicare a probelor 1X.
4. Se prepară 1 L de tampon de migrare de TAE 1X.
5. Se pune gelul cu placa în camera de electroforeză. Se toarnă tamponul de migrare în cuvă. Tamponul trebuie să acopere gelul cu un strat de aprox. 0,65 cm. Se îndepărtează cu grijă pieptenele.
6. Se transferă fiecare probă în godeul corespunzător
7. Se reglează voltajul la 5 volți/cm (măsurat ca distanță dintre cei doi electrozi. Se lasă la migrat timp de 2 ore.
8. După electroforeză se colorează gelul cu TAE conținând 0,5 μ g/ml ethidium bromid. Se agită ușor timp de 20 minute la temperatura camerei. Soluția de ethidium bromid se îndepărtează și se înlocuiește cu apă distilată. Se lasă la decolorare încă 20 de minute.
9. Utilizând un transiluminator (302 nm), se fotografiază gelul, se prelucrează și analizează imaginea.

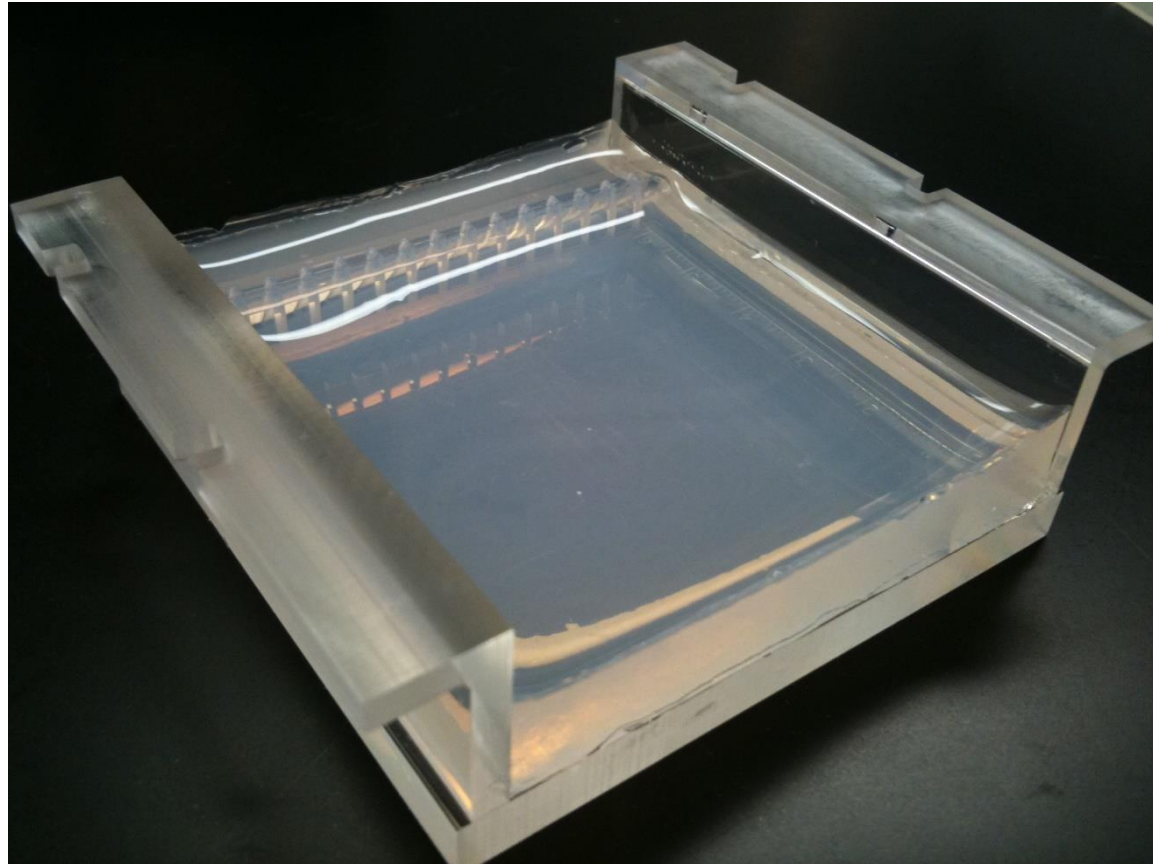


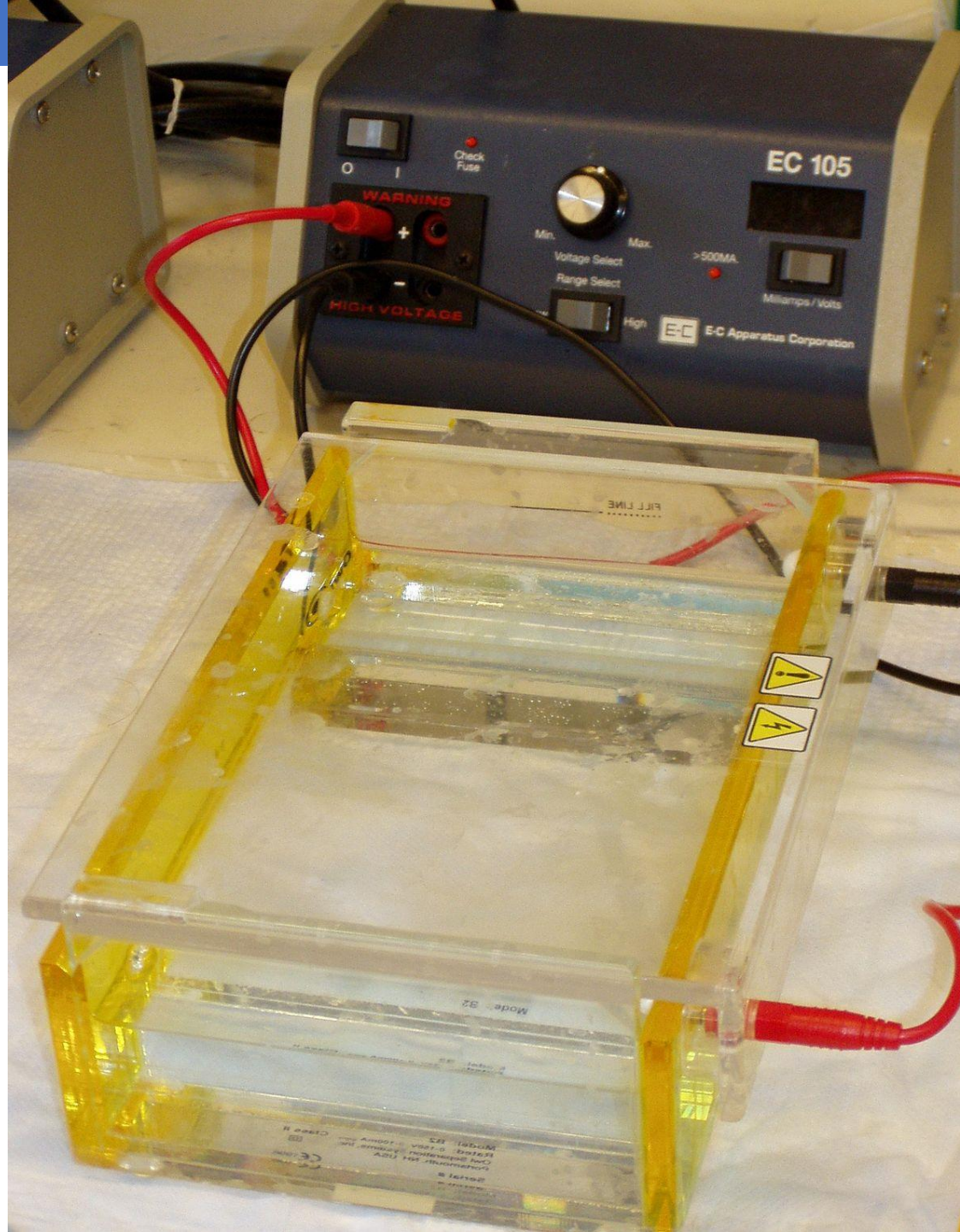
An overview of gel electrophoresis















shutterstock.com • 1436045954



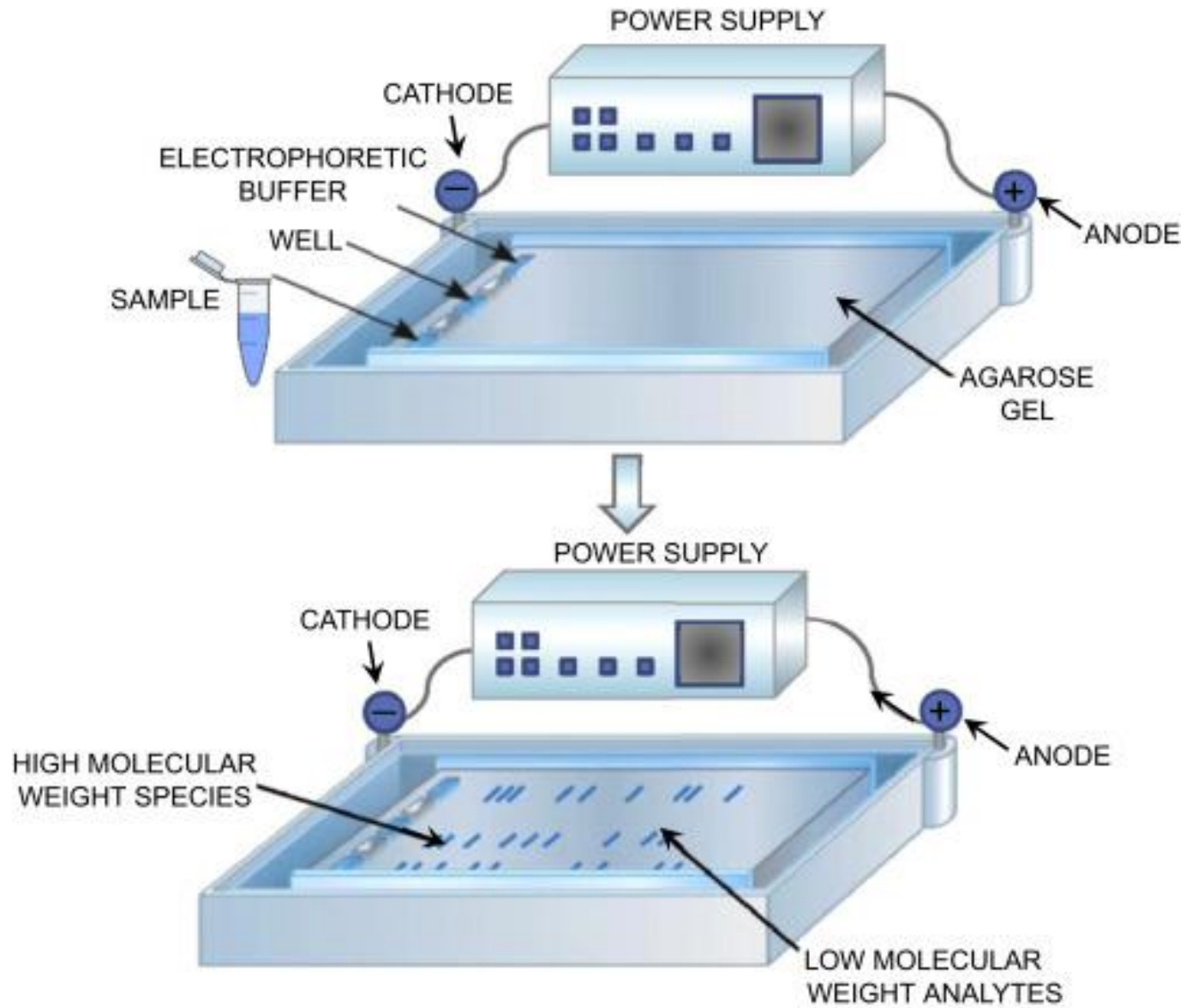


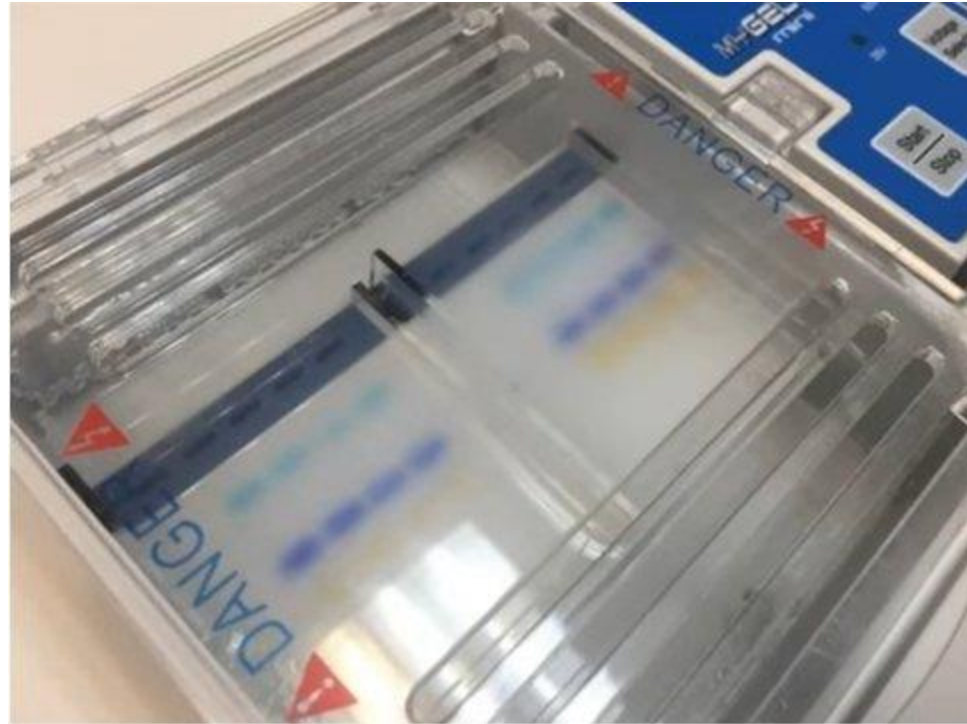
Electroforeza ADN în gel de agaroză

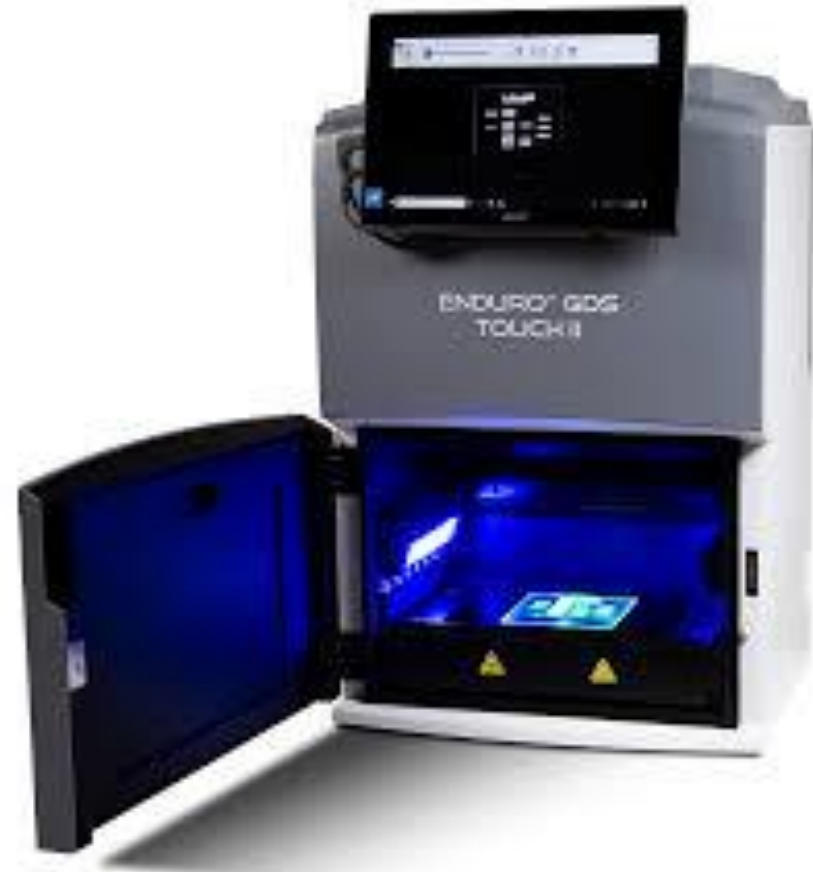
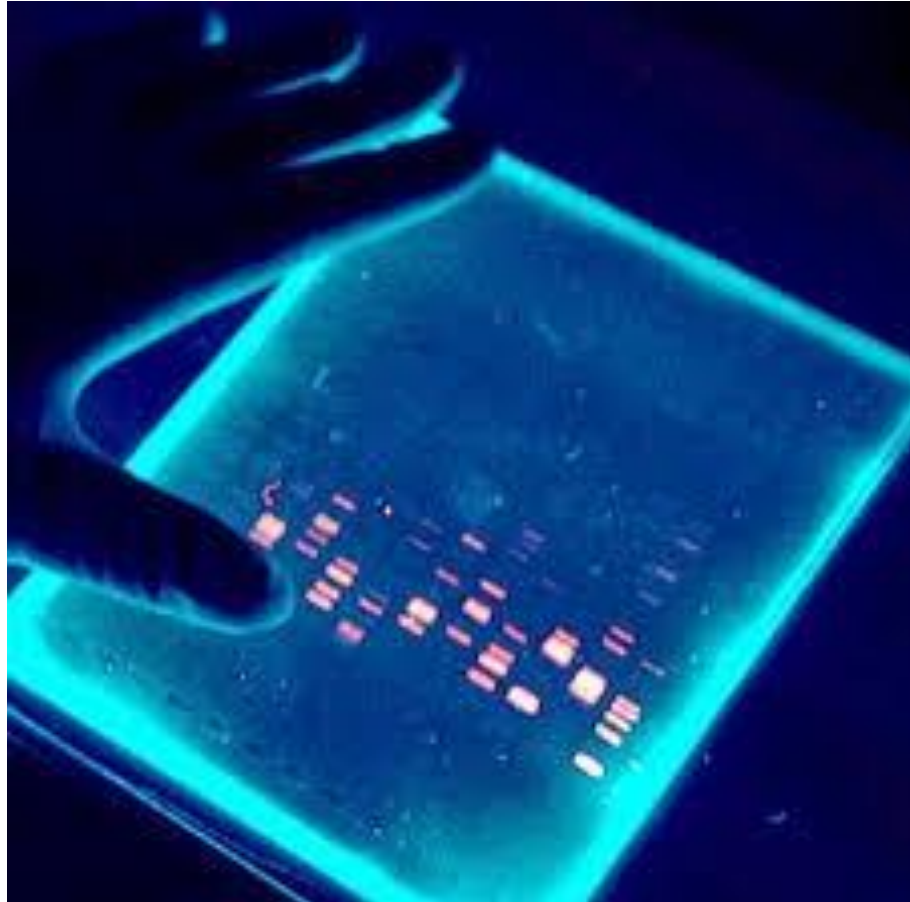
fara solutie de incarcare, solutie de acizi nucleici nu ar patrunde in gel

Solutie de incarcare 5x

Ficoll 400	5%
Bromphenol blue	0,1%
Xilene cyanol	0,1%
EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$)	100 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM





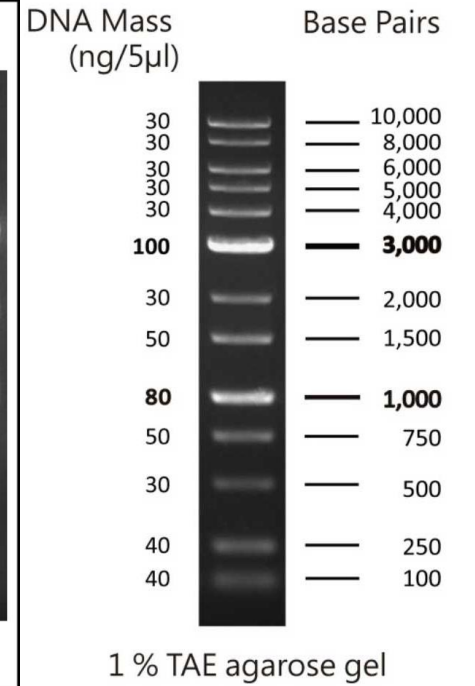
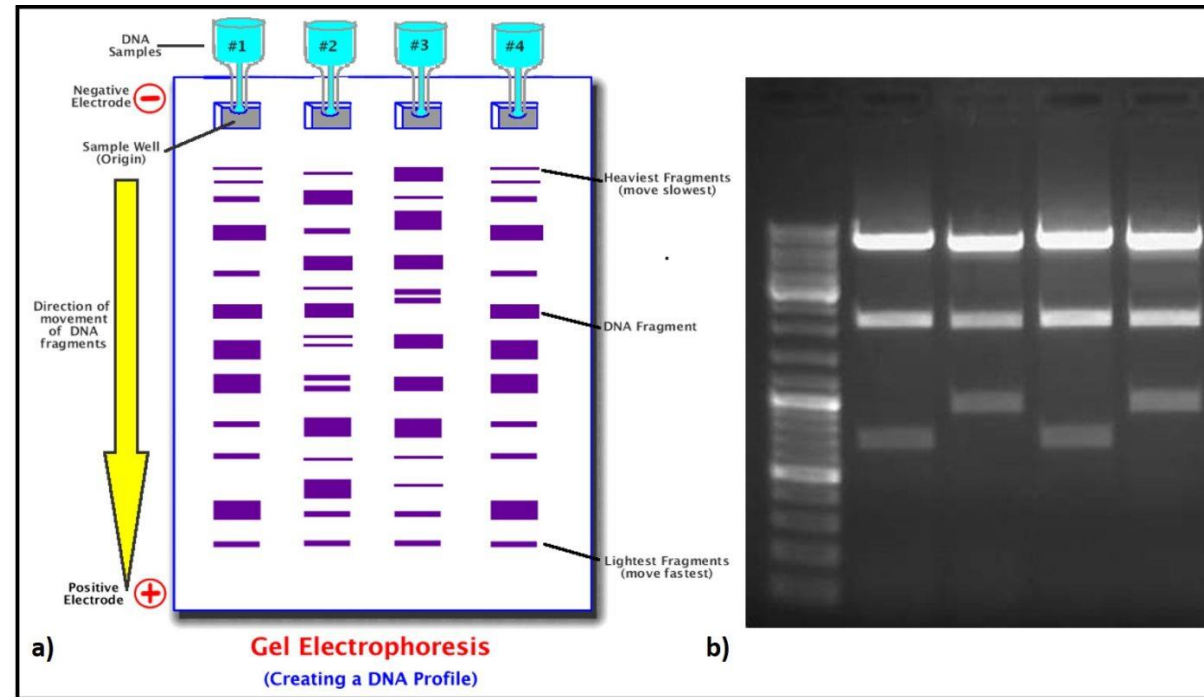


Electroforeza ADN în gel de agaroză

separarea pe baza de dimensiune a fragmentelor ADN

ladder = marker de greutate = rigla moleculara = amestec de fragmente ADN cu lungime cunoscuta

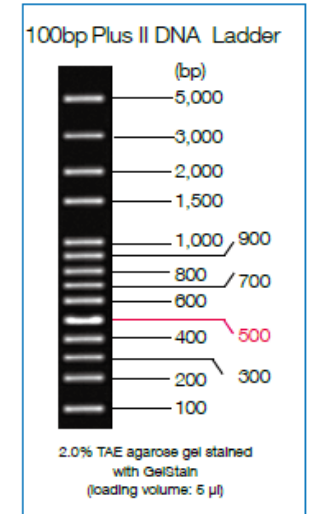
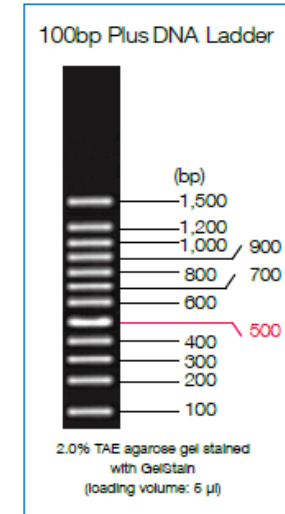
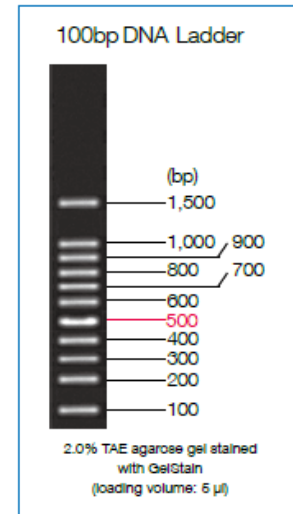
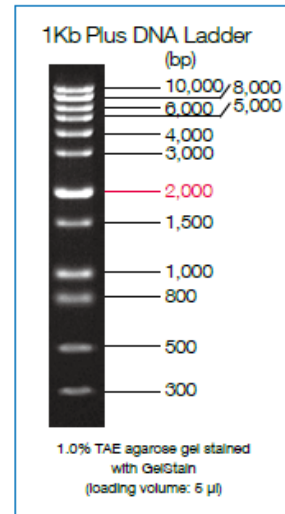
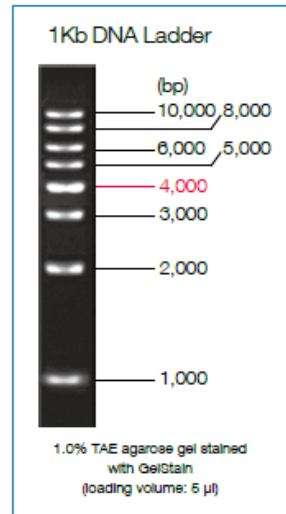
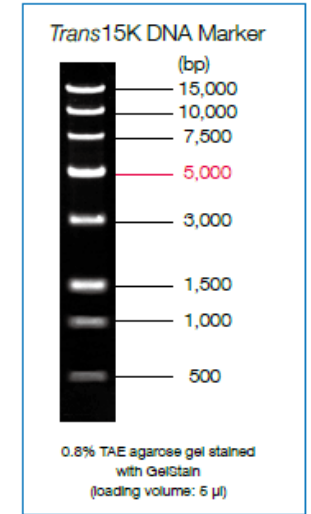
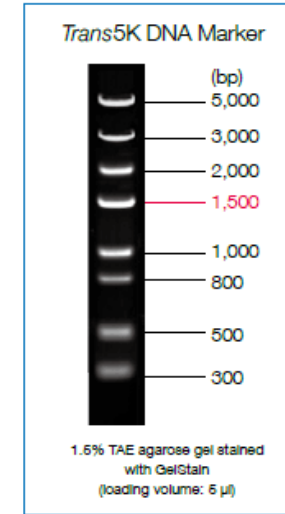
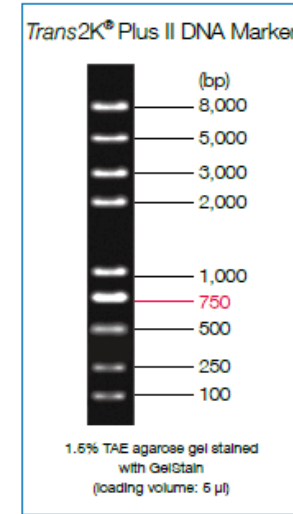
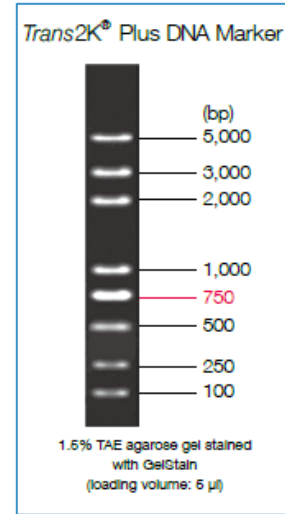
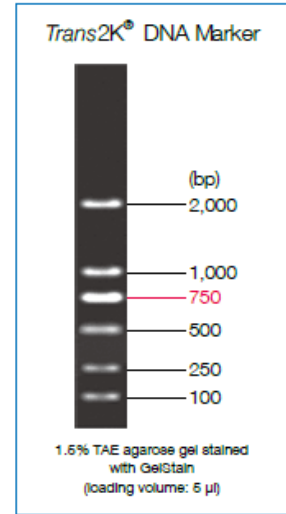
-> identificarea pe baza de dimensiune a fragmentelor ADN



Electroforeza ADN în gel de agaroză

ladder = marker de greutate =
rigla moleculara

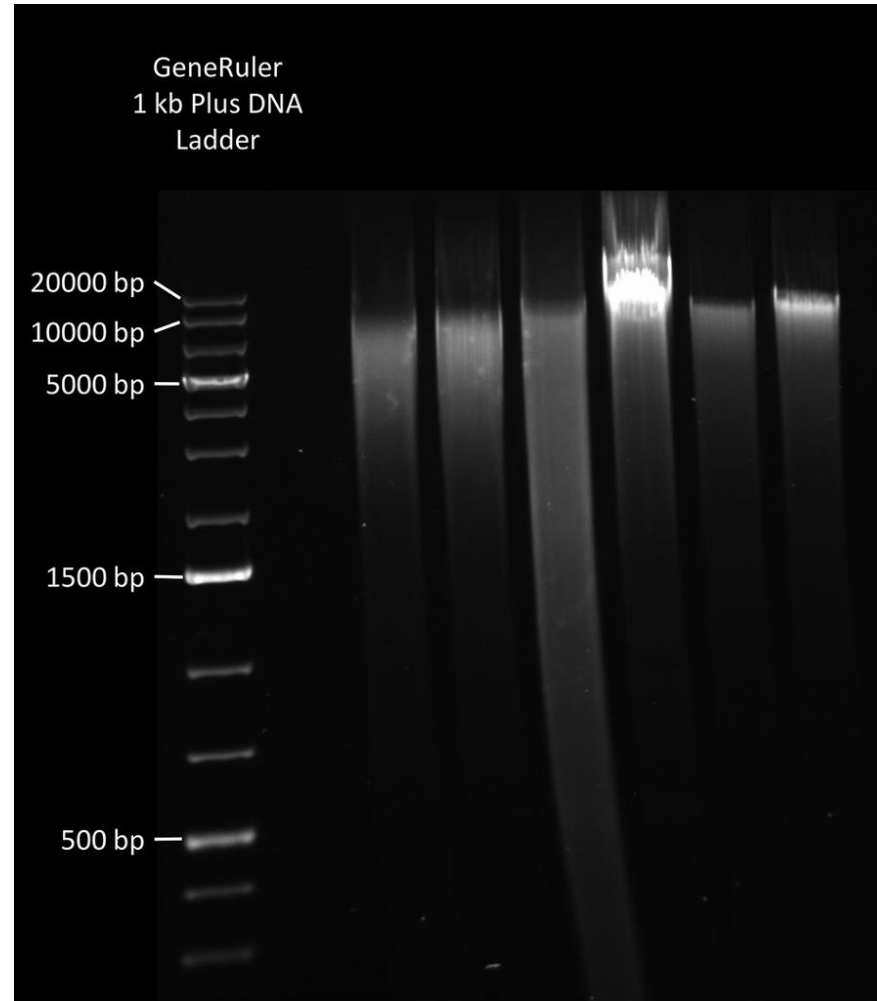
-> identificarea pe baza de
dimensiune a fragmentelor ADN





Challenge!

isolated DNA electrophoresis





DISCUȚII

