

LP9. Electroforeza. Tipuri de electroforez ă. Aplicațiile tehnicilor electroforetice în biologia moleculară.

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

- încărcătura electrică și dimensiunea moleculei;
- concentrația gelului;
- compoziția soluției tampon⁽¹⁾;
- puterea aplicată;

Tipuri de electroforeze folosite:

- electroforeza în gel de agaroză;
- electroforeza în gel de poliacrilamidă (PAAG);
- electroforeza în câmp pulsatil (Pulse-Field Gel Electrophoresis - PFGE);
- electroforeza capilară

A. Electroforeza în gel de agaroză are o putere de rezoluție mai mică în comparație cu PAAG, dar poate separa fragmente ADN dintr-un domeniu de lungime mai larg. Variind concentrația de agaroză se pot separa fragmente de la 100bp⁽²⁾ până la 50kb. Concentrația gelului se alege în funcție de lungimea fragmentelor vizate. Acest tip de electroforeză se realizează în plan orizontal, gelul fiind imersat în soluția tampon.

B. Electroforeza în gel de poliacrilamidă este foarte eficientă în separarea fragmentelor scurte de ADN (5-500 bp). Puterea de rezoluție este extrem de mare putând fi separate fragmente ADN ce diferă în dimensiune printr-o singură bază. PAAG se realizează în plan vertical, într-un câmp electric constant.

C. Electroforeza în câmp pulsatil (Pulse-Field Gel Electrophoresis - PFGE) - Fragmentele ADN cu o lungime de peste 15-20kb sunt separate printr-o tehnică electroforetică în care orientarea câmpului electric este modificată periodic (în 3 direcții: axul central al gelului, 60° la stânga, 60° la dreapta).

D. Electroforeza capilară este cea mai modernă dintre metode. Dezvoltată în paralel cu cea clasică, ea oferă avantajul automatizării complete. Permite separarea moleculelor încărcate electric în funcție de mobilitatea proprie într-un tampon cu un pH dat. Separarea are loc în capilare cu un diametru mai mic de 100 micrometri, încărcate cu un tampon format din diverși electroliți.

Avantajele electroforezei:

- este o metodă simplă și rapidă;
- permite vizualizarea directă a fragmentelor ADN folosind un colorant intercalant⁽³⁾ fluorescent⁽⁴⁾ (etidium bromid);

- dacă este necesar, ADN-ul ce formează benzile poate fi recuperat din gel și analizat suplimentar prin alte metode (clonare, amplificare, secvențiere, etc.).

Electroforeza în gel de agaroză

Principiu: La pH alcalin sau neutru, acizii nucleici au sarcină electrică globală negativă. Ca urmare, dacă sunt plasate într-un câmp electric, moleculele de acizi nucleici migrează la anod (+), permitând astfel separarea, identificarea și purificarea fragmentelor de ADN cu lungimi cuprinse între 100pb și 50kb. Viteza de migrare este limitată de forțele de frecare impuse de gel. În timp ce sarcina și/sau mărimea pot afecta viteza cu care moleculele traversează gelul, raportul sarcină/masă este același pentru molecule de ADN de diferite lungimi. De aceea, mărimea moleculei va fi cea care determină viteza cu care aceasta migrează, determinând o separare foarte bună a amestecurilor de ADN de diferite lungimi.

Tehnica parcurge trei etape:

1. Prepararea unui gel cu un conținut adecvat de agaroză având în vedere fragmentele ce urmează să fie separate;
2. Încărcarea probelor și migrarea la un voltaj și un timp optimi separării;
3. Vizualizarea gelului în lumina UV (dacă etidium bromidă a fost inclus în gel).

Mod de lucru

Prepararea gelului de agaroză

Materiale necesare

- 1X tampon TAE:
 - Soluția stoc 50X TAE, pH 7,2:

Tris base	242 g
Acid acetic glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M	100 ml
se adaugă Tris și EDTA la 500 ml de apă distilată, apoi se adaugă acidul acetic. Se aduce totul la 1 L cu apă distilată.	

-agaroză - este un polizaharid liniar extras dintr-o algă.

1. Se prepară gelul de agaroză 2% prin adăugarea a 2,0 g de agaroză la 100 ml de Tampon TAE 1X. Se marchează nivelul lichidului pe vas și apoi se dizolvă agaroză. Dizolvarea agarozei se face la cald și cu agitare. 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.

- Pentru vizualizarea fragmentelor de ADN post-migrare se adaugă în gelul în curs de răcire un volum de 3 μl de bromura de ethidium.

- Se pregătește placa de electroforeză.

- Se aplică pieptenele care va forma în gel godeuri egale în care se vor aplica probele.

- Se toarnă gelul pe placa de electroforeză. Placa trebuie să fie dispusă perfect orizontal. După turnare se lasă la răcit/polimerizat 20-30 minute.

Pregătirea probelor ADN

Materiale necesare

-probe ADN ce urmează a fi migrate;

-soluție de aplicare a probelor 5X:

Ficoll 400	5%
Bromphenol blue	0,1%
Xilene cyanol	0,1%
EDTA (Na ₂ EDTA x 2H ₂ O)	100 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM

3. Se prepară probele prin amestecarea a 9 μl din fiecare probă cu 2,5 μl soluție de aplicare a probelor 10X (Figura 1).

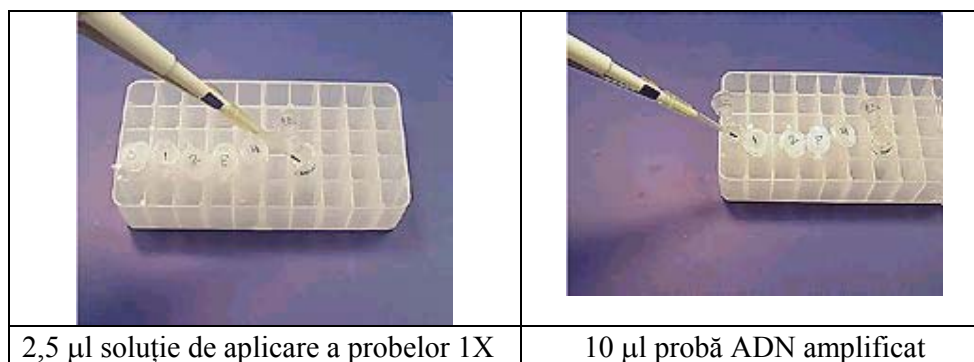


Figura 1. Prepararea probelor

4. Se prepară 1 L de tampon de migrare de TAE 1X.

5. După ce a polimerizat gelul, se îndepărtează cu grijă pieptenele și benzile laterale. Se pune placa cu gelul în camera de electroforeză. Se toarnă tamponul de migrare în cuvă. Tamponul trebuie să acopere gelul cu un strat de aprox. 0,65 cm.

6. Se transferă fiecare probă în godeul corespunzător (Figura 2).
7. Obligatoriu la fiecare migrare, într-unul dintre godeuri, se pipetează un Ladder, adică un amestec de fragmente de ADN cu lungimi cunoscute. Acest ladder permite identificarea lungimii probelor de ADN migrate.

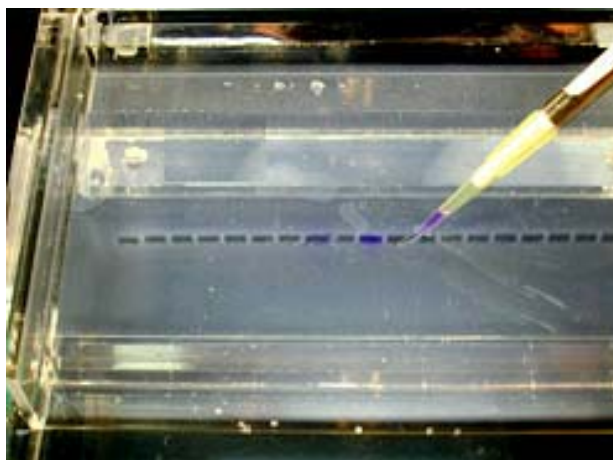


Figura 2. Transferul probelor în godeuri

8. Se reglează voltajul la 5 volți/cm (măsurat ca distanță dintre cei doi electrozi). Se lasă la migrat timp de 2 ore.
9. După electroforeză și utilizând un transiluminator (302 nm), se fotografiază gelul, se prelucrează și analizează imaginea.

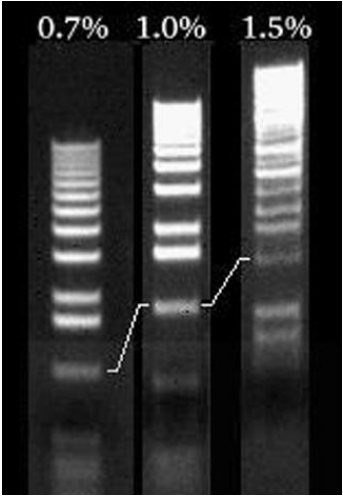
Notă: La analiza datelor, se pot observa benzi adiționale pe lângă banda ce reprezintă allelele. Acestea nu trebuie să ne alarmeze deoarece ele reprezintă heteroduplexuri de ADN ce se formează la electroforeza în agaroză cu mediu nenedenaturant.

Factori care influențează migrarea fragmentelor ADN în gelul de agaroză:

1. Dimensiunea moleculelor ADN. Viteza migrării fragmentelor ADN este invers proporțională cu dimensiunea lor.
2. Concentrația agarozei. Concentrația agarozei determină dimensiunea porilor gelului care acționează ca o sită moleculară. Astfel, la o concentrație mică a agarozei porii formați au dimensiuni mari permițând trecerea unor molecule mai mari (Tabel 1).

Tabel 1. Limitele separării în geluri de concentrații diferite

(%) 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

3. Coloranții intercalari. Etidium bromid este un colorant fluorescent folosit pentru a detecta ADN-ul în agaroză (Figura 3). Acesta reduce mobilitatea electroforetică a ADN-ului cu aproximativ 15%. Colorantul se insinuează între perechile de baze blocate, extinzând lungimea moleculelor liniare de ADN (Figura 4). **Atenție!** Etidium bromid este cancerigen și trebuie manipulat cu grijă.

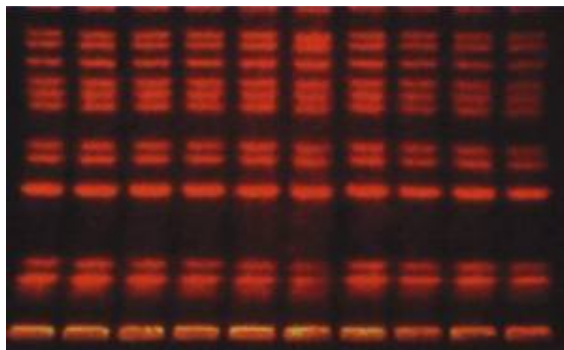


Figura 3. Electroforeza în gel de agaroză și colorarea acizilor nucleici cu etidium bromid

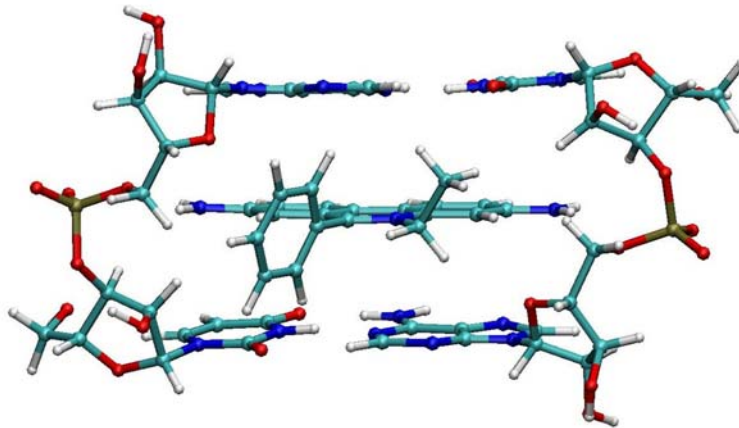


Figura 4. Etidium bromid intercalat între două baze perechi.

4. Compoziția soluției tampon în electroforeză. Mobilitatea electroforetică a ADN-ului este afectată de compoziția și tăria ionică a tamponului. Când concentrația 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 (Tabel 2). Cel mai folosit este Tris-Acetate (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.

Tabel 2. Cele mai folosite tipuri de soluții tampon

Tampon	Soluții de lucru	Soluții 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 0.5 M 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 0.5 M 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 0.5 M EDTA

Concluzii:

- electroforeza acizilor nucleici este o etapa obligatorie in aproape orice protocol de analiza a acizilor nucleici

Aplicații:

1. analiza produsilor de amplificare (ampliconi) obținuți prin reacția de polimerizare în lanț (PCR) - identificarea și/sau determinarea semicantitativă a fragmentelor ADN având diferite lungimi;
2. detectia și determinarea semicantitativa a ADN-ului genomic obținut în urma extracției din țesuturi;
3. separarea fragmentelor ADN rezultate în urma digestiei cu enzime de restricție.
4. evaluarea nivelelor de fragmentare a ARN-ului total purificat din diferite probe biologice.

Glosar

(1) Soluție tampon - soluție ce rezistă schimbărilor concentrațiilor ionilor hidroniu (H_3O^+) și hidroxid (HO^-) (consecutiv și modificărilor pH-ului) generate de adăugarea unor mici cantități de acid sau baze sau după diluare.

(2) bp – perechi de baze (ex.: A=T, G=C).

(3) Intercalar ADN - clasă de molecule ce se inseră reversibil în spațiul dintre două baze-pereche adiacente. Cele mai multe dintre aceste molecule sunt policiclice, aromatice, aceste caracteristici recomandându-le drept buni coloranți ai acizilor nucleici. Exemple: etidium, proflavină, daunomicină, doxorubicină și talidomidă. Intercalarii ADN sunt folosiți în tratamentul chimioterapic acționând prin inhibarea replicării și transcripției ADN-ului celulelor canceroase cu rată rapidă de multiplicare. Intercalarii sunt agenți mutageni putând induce modificări structurale în catena de ADN pe care o despiralizează și o alungește.

(4) Fluorescența - fenomen optic în care absorbția moleculară a unui foton determină emisia unui alt foton cu o lungime de undă mai mare. Diferența energetică dintre fotonii absorbiți și cei emiși este eliberată prin vibrații sau încălzire. Frecvent fotonul absorbit este în domeniul ultraviolet [UV - radiația electromagnetică cu o lungime de undă mai mică decât lumina vizibilă (400-700nm), dar mai mare decât razele X (10 - 0.01)] iar cel emis în spectrul vizibil.