

## ACIZI NUCLEICI. METODE DE SEPARARE. ELECTROFOREZA

### Introducere

În vederea separării acizilor nucleici, în funcție de scopul urmărit, se pot utiliza diverse metode de separare: centrifugarea, cromatografia, electroforeza.

Pentru separarea acizilor nucleici prin **centrifugare** se utilizează ultracentrifugarea în gradient de densitate într-o soluție de clorură de cesiu. În aceste condiții, ADN-ul uman se separă în patru benzi distincte în funcție de densitate, una principală, mai bine reprezentată, celelalte trei constituindu-se în benzi satelitice ce conțin ADN repetitiv. Această metodă, deși abandonată în cazul separării ADN, oferă posibilitatea obținerii de ARN în cantități crescute și de înaltă puritate din probe biologice, fiind încă utilizată în unele laboratoare unde cantitatea și puritatea ARN obținut este crucială pentru analizele ulterioare.

Din cadrul metodelor **cromatografice**, pentru separarea acizilor nucleici se utilizează cu predilecție metodele HPLC, mai exact o variantă a acesteia numită dHPLC (d-denaturare), cromatografia de gel filtrare și cromatografia de schimb ionic.

- dHPLC este o metodă de screening a mutațiilor punctiforme prin detecția heteroduplecșilor ce se formează în cazul existenței unei mutații în urma denaturării și renaturării treptate a produșilor PCR, separându-i pe cei ce prezintă mutația de cei normali, ce nu prezintă mutații.
- Cromatografia de gel filtrare se utilizează pentru purificarea produșilor PCR, separându-i pe aceștia de primerii neconsumați în cursul reacției de amplificare, nucleotide, diverși ioni existenți în soluție.
- Cromatografia de schimb ionic este utilizată pentru extracția rapidă, în cantități suficiente și puritate bună a ADN și ARN din probe biologice. Metoda se bazează pe faptul că la diverse valori de pH, moleculele de acid nucleic sunt reținute pe o membrană de siliciu, fiind apoi eluate cu ajutorul unei soluții tampon de pH diferit ce creează repulsie electrostatică între acidul nucleic și membrană. În cazul ultimelor două metode cromatografice descrise se utilizează centrifugarea pentru a mări timpul de eluție.

**Electroforeza** acizilor nucleici este o etapă obligatorie în orice protocol de analiză a acizilor nucleici, realizând următoarele :

- separarea fragmentelor ADN rezultate în urma digestiei cu enzime de restricție
- verificarea amplificării PCR
- identificarea și/sau determinarea semicantitativă a fragmentelor ADN rezultate în urma amplificării PCR
- detecția și determinarea semicantitativă a ADN genomic obținut în urma extracției din țesuturi

Analizele uzuale ale ADN/ARN sunt utilizate în: detecția mutațiilor în diferite afecțiuni, diagnosticarea bolilor genetice, a cancerelor, diagnosticul microbiologic, analiza fragmentelor ADN nou sintetizate, analiza genomică, teste

de paternitate și identificare de persoane, determinarea profilului genetic al bolilor, teste de filogenie etc.; toate aceste analize cuprinzând în mod obligatoriu și o etapă de electroforeză.

Acizii nucleici, datorită numărului mare de resturi fosfat, au o puternică încărcătură negativă, migrând în câmpul electric spre anod.

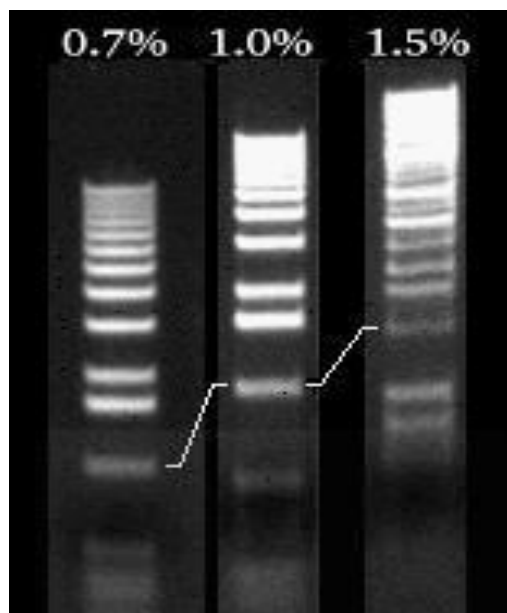
În soluție liberă, la pH neutru sau alcalin, acizii nucleici cu mase moleculare diferite prezintă raporturi sarcină/masă foarte apropiate și nu pot fi separați. Pentru separare se folosesc matrici de gel (agaroză sau poliacrilamidă) în care efectul de sită moleculară (datorată rezistenței opuse de matrice la migrare) permite separarea moleculelor de acizi nucleici.

Mobilitatea unui fragment ADN într-un gel este invers proporțională cu masa moleculară și este influențată de mai mulți factori, prin a căror modulare se poate optimiza separarea electroforetică:

- **concentrația gelului:** alegerea concentrației gelurilor se face în funcție de domeniul de masă a moleculelor ce trebuie separate. În principiu, gelurile de agaroză sunt folosite pentru separarea acizilor nucleici cu mase mari (inclusiv a moleculelor întregi de ADN) în timp ce diferențierea moleculelor de acizi nucleici cu mase moleculare mici se face în geluri de poliacrilamidă (grad mare de înrețelare). Puterea de rezoluție crește cu concentrația T a gelurilor: concentrații mari ale gelului ( $T \geq 10\%$ ) permit separarea moleculelor de dimensiuni mici în timp ce concentrații scăzute ( $T \leq 10\%$ ) permit separarea moleculelor de dimensiuni mari.

- **tensiunea aplicată:** În condiții ideale, în care temperatura în gel este constantă, viteza de migrare este proporțională cu tensiunea aplicată. Creșterea temperaturii reduce însă vâscozitatea gelului, producând distorsiuni ale migrării. Din acest motiv, o bună rezoluție pentru fragmentele mai mari de 2 kb este obținută prin aplicarea unei tensiuni de maxim 5 V pe cm de gel (valoarea în cm este distanța dintre cei doi electrozi și nu lungimea gelului).

- **tamponul de electroforeză:** rolul tamponelor de electroforeză este de a realiza un pH și o putere ionică constante, la valori optime pentru separare. În cazul ADN bicatenar, tamponurile cele mai frecvent folosite sunt TAE (Tris-acetat-EDTA) și TBE (Tris-borat-EDTA).



**Figura 3. Separarea fragmentelor de ADN în geluri de agaroză de concentrații diferite. Poziția fragmentului de 1000 pb este indicată în fiecare coloană**

- **efectul bromurii de etidiu:** Bromura de etidiu este colorantul fluorescent utilizat cel mai frecvent pentru evidențierea benzilor de acizi nucleici separate prin electroforeză. Legarea bromurii de etidiu la moleculele de ADN modifică atât masa cât și rigiditatea acestora, diminuând astfel mobilitatea electroforetică. Poate fi adăugat direct în gelul de electroforeză în cursul preparării acestuia sau amestecat cu proba de fragmente de ADN ce urmează a fi analizată.

- **agenții denaturanți:** Se folosesc pentru a combate fenomenele de agregare și adsorbție a moleculelor de acizi nucleici pe matricea de gel, dar și pentru înlăturarea diferențelor conformaționale. Cel mai frecvent folosiți sunt ureea, formamida (nu se folosește pentru gelurile de agaroză!) și formaldehida.

### **Aplicație practică**

**Electroforeza fragmentelor ADN rezultate în urma amplificării (PCR) pe gel de agaroză**

#### **Principiu**

Fragmentele de ADN migrează într-o matrice de gel de agaroză, în câmp electric și la pH alcalin, separându-se sub forma unor benzi electroforetice. Fragmentele de ADN astfel separate se leagă de bromura de etidiu inclusă în gel, iar benzile fluorescente rezultate sunt vizualizate cu ajutorul unui transiluminator UV și fotografiate.

#### **Reactivi. Aparatură. Materiale**

##### **Reactivi**

- agaroză, de puritate electroforetică

- apă bidistilată
- tampon stoc TAE (Tris-acetat-EDTA), pH=7,60

**Compoziție:** 242 g Tris bază; 57,1 ml acid acetic glacial; 18,61 g EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

**Preparare:** se dizolvă 242 g Tris bază și 18,61 g EDTA în 500 ml apă bidistilată. Se adaugă 57,1 ml acid acetic glacial și se verifică pH-ul soluției obținute. Se corectează valoarea pH-ului (dacă este nevoie) fie cu acid acetic glacial, fie cu Tris bază și se aduce la volumul de 1 litru cu apă bidistilată.

- tampon de lucru TAE

**Preparare:** se diluează soluția tampon stoc 1/50 cu apă bidistilată.

- bromură de etidiu: soluție apoasă 10 mg/ml (atenție!, reactiv toxic, a se evita contactul cu pielea)
- amestec de migrare (se amestecă cu proba ADN și conține indicatorii de migrare albastru de bromfenol și xilencianol)

**Compoziție:** soluție stoc, care conține 50% glicerol; 0,25% brom-fenol; 0,25% xilen-cianol în tampon de lucru TAE.

- marker ADN (amestec de fragmente de ADN având următoarele mărimi: 2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 396, 350, 222, 179, 126, 75, 65, 51 și 36 perechi de baze)
- probe ADN rezultate în urma amplificării PCR, cu concentrații între 10-100 ng/ $\mu\text{l}$

#### **Aparatură**

- aparat de electroforeză Bio-Rad Mini-Sub Cell GT (figura 4)
- sursă de curent continuu Bio-Rad Power Pac 300V
- transiluminator UV Fisher, cu  $\lambda = 302 \text{ nm}$ , pentru măsurători de fluorescență
- plită electrică
- termostat cu apă 60°C
- balanță analitică

#### **Materiale**

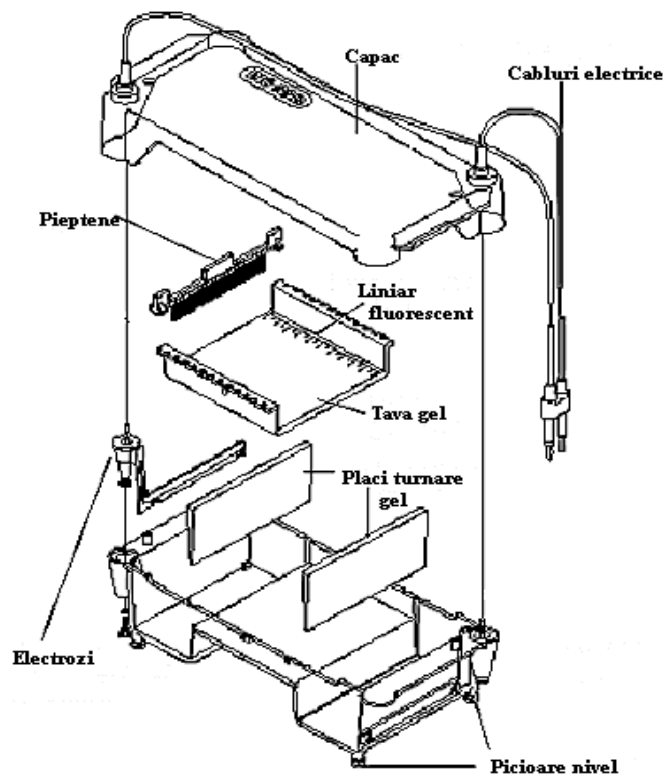
- dispozitiv formare geluri
- pipete automate 0,5-10  $\mu\text{l}$  și 5-50 $\mu\text{l}$
- vârfuri pipete
- mănuși latex
- tuburi Eppendorf 1,5 ml
- baghete sticlă
- cilindri gradatți 50 ml
- pahare Berzelius 50 ml
- sticlă de ceas

#### **Mod de lucru**

##### **Prepararea gelului de agaroză:**

- se montează dispozitivul de formare a gelului.
- într-un pahar Berzelius de 50 ml, se cântăresc 0,1 grame agaroză.
- se adaugă 20 ml tampon de lucru TAE.

- se încălzește pe plită până la fierbere, împiedicând evaporarea prin așezarea sticlei de ceas peste gura paharului. Se fierbe apoi până la dizolvarea completă a particulelor de agaroză.
  - cu ajutorul unei cleme, se introduce paharul în termostată, după îndepărtarea în prealabil a sticlei de ceas.
  - se introduc 3  $\mu$ l soluție bromură de etidiu direct în soluția din pahar. Se agită până la dizolvare.
  - după 2-3 minute, timp în care soluția a ajuns la aproximativ 60°C, aceasta se toarnă în tava fixată în dispozitivul de formare a gelului
  - se fixează pieptenele în gel, pentru a produce godeurile în care se vor pune probele.
  - se lasă 20 minute la temperatura camerei.
  - se scoate cu grijă pieptenele din gel
  - se scoate tava cu gel din dispozitivul de formare
- Prepararea probelor:
- în tuburi Eppendorf de 0,5 ml se introduc câte 10  $\mu$ l din probele ADN și câte 5  $\mu$ l amestec de migrare
  - în tubul de probă marker se introduc 10  $\mu$ l marker ADN și 5  $\mu$ l amestec de migrare



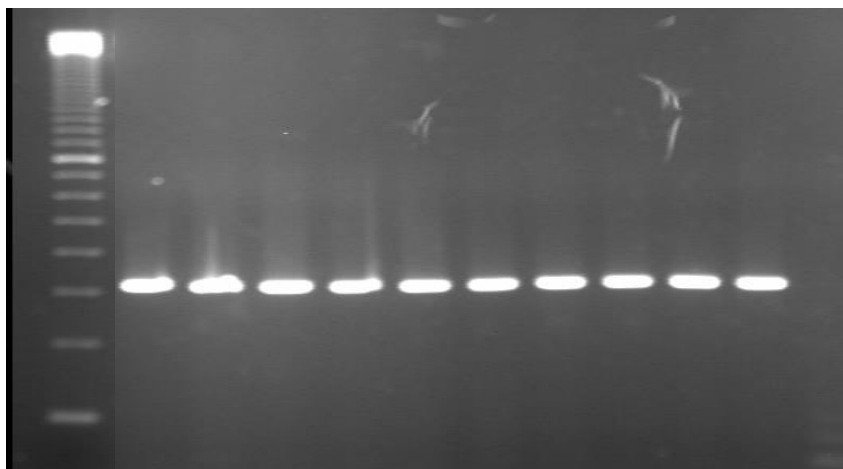
### Componentele sistemului Bio-Rad Mini-Sub Cell GT

#### Aplicarea probelor și efectuarea electroforezei:

- în cuvele aparatului de electroforeză se introduc 300 ml soluție tampon de lucru TAE
- se fixează tava cu gelul în cuva aparatului de electroforeză, cu godeurile orientate spre catod (gelul trebuie să fie acoperit cu un strat gros de aproximativ 6-8 mm soluție tampon)
- se aplică câte 12  $\mu$ l din probe în godeurile din gel, folosind o micropipetă și vârfuri diferite pentru fiecare probă
- se pune capacul aparatului de electroforeză
- se conectează aparatul la sursa de curent
- se conectează sursa la rețea și se fixează tensiunea la o valoare constantă de 75 V
- se pornește sursa
- se lasă probele să migreze 20-30 de minute, timp în care indicatorul albastru de brom-fenol ajunge la marginea gelului, după care se oprește sursa de curent

#### **Vizualizarea benzilor**

- se scoate capacul aparatului de electroforeză, se scoate tava și se pune pe hârtie de filtru, pentru îndepărtarea tamponului de pe pereții tăvii
- se pune tava pe suportul transparent al transluminatorului și se acoperă cu capacul de protecție
- se pornește transluminatorul și se fixează pe lungimea de undă de 302 nm
- se compară benzile din probele ADN cu cele ale fragmentelor ADN din proba marker ADN
- se confirmă în acest fel realizarea amplificării (în cazul probelor PCR) și se determină aproximativ mărimea fragmentului ADN separat.
- gelul se poate și fotografia, utilizând în acest scop un aparat tip Polaroid (figura 5)



**Imagine fotografică a electroforezei unor probe de ADN (amplificare PCR) și a unei probe marker**