

# Modelo matemático que describe la migración del ADN lineal en las minicámaras de Electroforesis de Campos Alternantes Transversales del Sistema Guefast06®

Yainelis Garrido-Nicot, Lilia López-Cánovas, Evelio González-Dalmau\*, David Higginson-Clark<sup>†</sup>, Karen León-Arcia, Ana María Riverón-Rojas<sup>†</sup>

Departamento de Biología Molecular, Centro de Neurociencias de Cuba. Avenida .25, No. 15202, y calle.158, Cubanacán, Playa. Código Postal.10600. Apartado Postal 6412. La Habana, Cuba.<sup>\*</sup>Departamento de Química-Física, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Avenida. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa. Código Postal. 11300. Apartado Postal 6072. La Habana, Cuba.<sup>†</sup>Fallecido guanty@cneuro.edu.cu

Recibido: 15 de enero de 2014.

Aceptado: 28 de mayo de 2014.

Palabras clave: *electroforesis de campos alternantes transversales, migración del ADN, tiempo de reorientación, velocidad de migración.*

Key words: transversal alternating pulsed electric field; DNA migrations; DNA reorientation time; Migration velocities.

**RESUMEN.** En la actualidad no existen ecuaciones que describan la migración de moléculas de ADN lineal en las minicámaras de Electroforesis de Campos Alternantes Transversales (TAFE). El diseño y predicción de las condiciones experimentales en este sistema se realiza de manera empírica, lo cual es ineficiente, y ocasiona pérdida de tiempo y reactivos. Las ecuaciones de la migración del ADN lineal en el sistema de Electroforesis de Campos Eléctricos Homogéneos en un Contorno Fijo (CHEF), no son aplicables al sistema TAFE pues, ni el campo eléctrico, ni el ángulo de reorientación son constantes a lo largo del gel. En este trabajo, se modifica la ecuación de la migración de las moléculas lineales de ADN en las cámaras y minicámaras CHEF y se adapta para las minicámaras TAFE. Para ello, se tuvo en cuenta que en estas, la intensidad del campo eléctrico y el ángulo de reorientación no son constantes a lo largo del gel. La ecuación modificada se ajustó con 254 puntos experimentales y se validó por el método de re-muestreo ‘dejando uno fuera’. Los patrones electroforéticos de ADN de tamaños conocidos simulados con la ecuación modificada reprodujeron los obtenidos experimentalmente con un 86,7 % de eficiencia. Esta ecuación permite el diseño a priori de las condiciones experimentales para separar en las minicámaras TAFE el ADN de microorganismos cuyo genoma haya sido secuenciado, lo que facilitaría el establecimiento de los protocolos de trabajo, y garantizaría ahorro de tiempo y reactivos químicos en la obtención de los resultados correspondientes.

**ABSTRACT.** Up to now there is no specific equation to predict the linear DNA migration under Transverse Pulsed Field Gel Electrophoresis (TAFE) minichambers conditions. Consequently, the selection of the experimental electrophoresis conditions for miniTAFE system is currently done

by trial and error, which is inefficient because it takes a lot of time and reagent to determine the optimal conditions. There are predictors for the linear DNA migration under Contour Clamped Homogeneous Electric Fields (CHEF) system; however they are not applicable to miniTAFE because the electric field and the reorientation angle formed between the electric field forces lines vary throughout the gel. Therefore, the equation that describes the migration of linear DNA molecules in the gel of CHEF chambers was modified. The values of the electric field at each point of the miniTAFE gel were re-estimated. Also there were considered the variability of the reorientation angle of the TAFE minichamber and the trigonometric relationships between the DNA migrations in each direction of the applied field. The new predictor describes the migration of DNA molecules in the miniTAFE gel. It was adjusted with 254 experimental points and validated by the re-sampling 'leave one out' method. The virtual electrophoretic DNA patterns of known sizes, obtained with the modified equation, reproduced the experimental results with an 86,7 % of efficiency. This equation allows the *a priori* design of the miniTAFE experimental conditions to separate the DNA molecules with known sequences, facilitating the establishment of working protocols that ensures saving time and chemical reagents.

## INTRODUCCIÓN

La Electroforesis de Campos Pulsantes (ECP) permite separar moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) con tamaños mayores de 20 kilobases (kb) en geles de agarosa. Mediante esta técnica las moléculas se separan en virtud de que el campo eléctrico es activado periódicamente en dos direcciones diferentes del gel. Las reorientaciones del campo provocan que las moléculas de ADN modifiquen su dirección de migración y utilicen una porción del tiempo de duración del pulso (*tp*) para reorientarse en la nueva dirección del campo, mientras que el resto del *tp* lo usan para migrar.<sup>1</sup> El tiempo que tarda una molécula en reorientarse se denomina tiempo de reorientación (*tr*) y depende de su tamaño. El *tr* es menor cuanto menor sea la molécula. En cada pulso, la molécula de menor tamaño aventaja a la de mayor tamaño pues le queda un mayor tiempo para migrar. Luego de un número suficiente de pulsos eléctricos alternos ambos grupos de moléculas se separan.<sup>1</sup>

Existen múltiples configuraciones de ECP. Entre las más utilizadas están la Electroforesis de Campos Eléctricos Homogéneos en un Contorno Fijo (CHEF)<sup>2</sup> y la Electroforesis de Campos Alternantes Transversales (TAFE).<sup>3</sup> En la configuración CHEF, la intensidad del campo eléctrico y el ángulo de reorientación formado entre los campos son constantes a lo largo del gel. La distancia que migra una molécula de ADN durante un pulso completo se denomina migración por pulso y esta migración también es constante en esa dirección. Para este sistema se dispone de ecuaciones que describen la migración (*D<sub>i</sub>*) del ADN lineal.<sup>4</sup>

En la configuración TAFE, la intensidad del campo eléctrico y el ángulo de reorientación formado no son constantes a lo largo del gel. Como consecuencia, la migración por pulso de las moléculas de ADN tampoco lo es. Sin embargo, se generan trayectos de migración más rectos que los del sistema CHEF, los patrones de bandas obtenidos son más nítidos y por lo tanto, más fáciles de comparar.<sup>5</sup> Hasta el momento, no se dispone de ecuaciones que predigan la migración de las moléculas de ADN lineal para el sistema TAFE. La ecuación descrita para el CHEF no es aplicable al TAFE, pues no considera las variaciones del campo eléctrico y el ángulo de reorientación, propias de este último. Es posible modificar el modelo que describe la migración de las moléculas lineales de ADN en las cámaras CHEF, introduciendo las correcciones en cuanto a la intensidad de campo eléctrico, ángulo de reorientación y geometría de las minicámaras, ya que ambos sistemas utilizan el mismo principio físico de separación. El objetivo de este trabajo es modificar la ecuación de la migración del ADN en la configuración CHEF, para describir su migración en la minicámara TAFE. De esta manera, mejorará el diseño y predicción de las condiciones experimentales para este sistema, que actualmente es ineficiente, ya que al realizarse de manera empírica, consume gran cantidad de tiempo y reactivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Modelo matemático que describe la migración del ADN lineal en la minicámaras CHEF (miniCHEF)

En este modelo, se considera a la migración por pulso como dos funciones lineales del  $tp$ . Se asume que la migración por pulso durante la reorientación se efectúa a una velocidad constante, llamada velocidad de migración ( $vr_x$ ), que después de la reorientación también migra a otra velocidad constante llamada velocidad de migración ( $vm_x$ ). Las ecuaciones que conforman el modelo son:<sup>6</sup>

$$D_x = \sum_{k=1}^n d_{xk} N p_k \quad (1)$$

donde:

$N p_k$ : número de pulsos aplicados.

$d_{xk}$ : migración por pulso de la molécula  $x$  durante el tiempo de pulso  $k$  y se calcula según la expresión:<sup>6</sup>

$$d_{xk} = vr_x \cdot tp_{xk} \cdot \Gamma(tp_{xk} - tr_x) + vm_x \cdot (tp_{xk} - tr_x) \cdot [1 - \Gamma(tp_{xk} - tr_x)] \quad (2)$$

$vr_x$  y  $vm_x$  son las velocidades de la molécula  $x$  durante y después de la reorientación, respectivamente. En este modelo  $vr_x$ ,  $vm_x$  y  $tr_x$  se calculan según las expresiones siguientes:<sup>6</sup>

$$vm_x = \frac{0,0207 \cdot Q \cdot E^{1,45}}{8\pi\eta L^{1,55}}, \quad vr_x = \frac{0,665 \cdot Q E^{1,76}}{8\pi\eta L^{1,08}}, \quad tr_x = 0,134 \cdot \left[ \frac{L^{1,14}}{vr_x} \right]^{0,926}$$

Donde:

$\Gamma(tp_{xk} - tp_x)$ : función condicional que toma valor 1 si  $(tp_{xk} \leq tp_x)$  y 0 si  $(tp_{xk} > tp_x)$

‘ $Q$ ’: carga neta (en statcoulomb) de la molécula de ADN y se calcula como:

$$Q = 1 \cdot e^{-1} \cdot pb$$

Donde:

$e^{-1}$ : carga del electrón ( $1,602 \cdot 10^{-19}$  C)

‘ $pb$ ’: cantidad de pares de bases que contiene la molécula lineal de ADN.

$L$ : largo (en cm) del contorno de la molécula lineal de ADN y se calcula como  $0,34 \cdot nm \cdot pb$ .

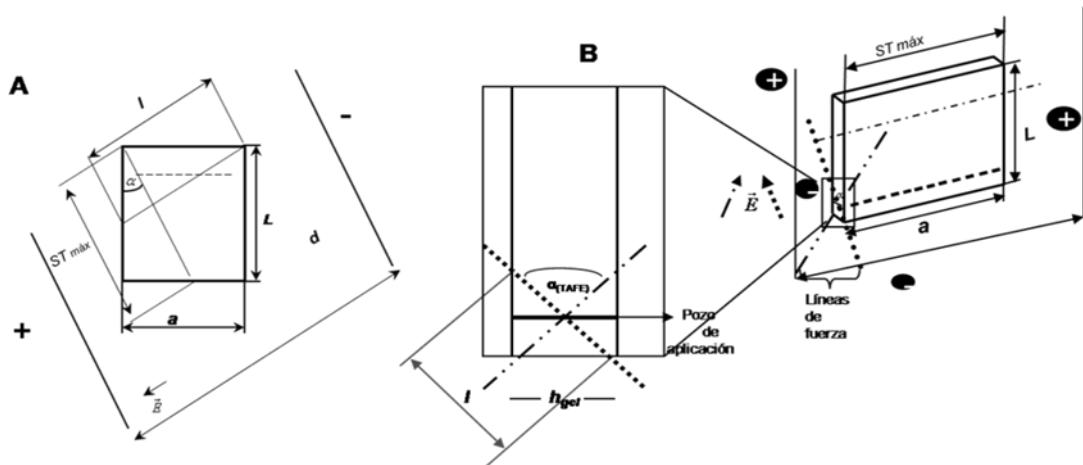
$E$ : campo eléctrico ( $\frac{V}{cm}$ ).

$\eta$ : viscosidad dinámica (en poises). Esta última se calcula interpolando el valor de la temperatura de la disolución estabilizadora en un polinomio que describe la relación entre la viscosidad del agua y su temperatura en grados Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ).

### Supuestos teóricos para modelar el gradiente de campo eléctrico generado en la minicámaras TAFE (miniTAFE)

Las minicámaras TAFE utilizan un gel rectangular cuya área de sección transversal (A) es diferente a la del gel cuadrado que utilizan las cámaras y minicámaras CHEF de las que se obtuvieron los datos para modelar la migración de las moléculas lineales de ADN.

Por esta razón, la distancia ( $I$ ) que recorre la corriente a través de los minigelos del TAFE y el CHEF es distinta (Fig. 1).



**Fig.1.** Relaciones geométricas entre el gel y el campo eléctrico generado en el interior del arreglo de electrodos de cámaras de ECP. A) Gel cuadrado configuración CHEF. B) Gel rectangular configuración TAFE.  $a$ : ancho del gel,  $L$ : largo del gel,  $h_{gel}$ : grosor del gel,  $ST_{\max}$ : ancho máximo de la sección transversal del gel al paso de la corriente,  $I$ : longitud atravesada por la corriente en el gel,  $E$ : campo eléctrico,  $\alpha_{(TAFE)}$ : ángulo de reorientación,  $\alpha = 30^\circ$ , +: ánodo, -: cátodo.

La corriente eléctrica ( $I$ ) que fluye a través de una disolución electrolítica de conductancia específica ( $\sigma$ ), en una celda de conductancia, se calcula como  $I = \sigma \cdot A \cdot E$ .<sup>7</sup> La intensidad del campo eléctrico ( $E$ ) se define como la diferencia de potencial eléctrico ( $V$ ) entre dos puntos, dividida por la distancia que recorre la corriente eléctrica a través de la disolución entre esos dos puntos. El área de la sección transversal del gel ( $A$ ) se define como:

$$A = ST_{\max} \cdot h_{gel},$$

Donde:

$ST_{\max}$ : ancho máximo de la sección transversal del gel al paso de la corriente

$h_{gel}$ : altura de dicha sección transversal.

Entonces:

$$I = \sigma \cdot \frac{V}{l} \cdot ST_{\max} \cdot h_{gel} \quad (3)$$

Si se considera que fluyen corrientes iguales ( $I_c = I_t$ , donde los subíndices  $c$  y  $t$  se refieren a miniCHEF y miniTAFE respectivamente), que ambas minicámaras contienen la misma disolución estabilizadora ( $\sigma_c = \sigma_t$ ) y que usan minigelos de iguales grosores ( $h_{gelc} = h_{gelt}$ ), entonces dichos factores se simplifican en la igualdad  $I_c = I_t$  y se obtiene la expresión:  $ST_{\max c} \frac{V_c}{l_c} = ST_{\max t} \frac{V_t}{l_t}$ .

Si en esta expresión se sustituyen los factores  $ST_{\max c}$  y  $l_c$  tomando en cuenta sus relaciones trigonométricas con las dimensiones (ancho y largo) del minigel cuadrado, donde:

$$ST_{\max c} = \frac{l_c}{\cos 30^\circ} \text{ y } l_c = \frac{a_c}{\cos 30^\circ} \text{ (Fig. 1), se obtiene la expresión: } \frac{\frac{V_c l_c}{a_c}}{\frac{V_t l_t}{a_t}} = ST_{\max t} \cdot \frac{V_t}{l_t}$$

Teniendo en cuenta que el minigel es cuadrado ( $a_c = L_c$ ) y que  $ST_{\max t} = a_t$  (Fig. 1), la expresión queda:

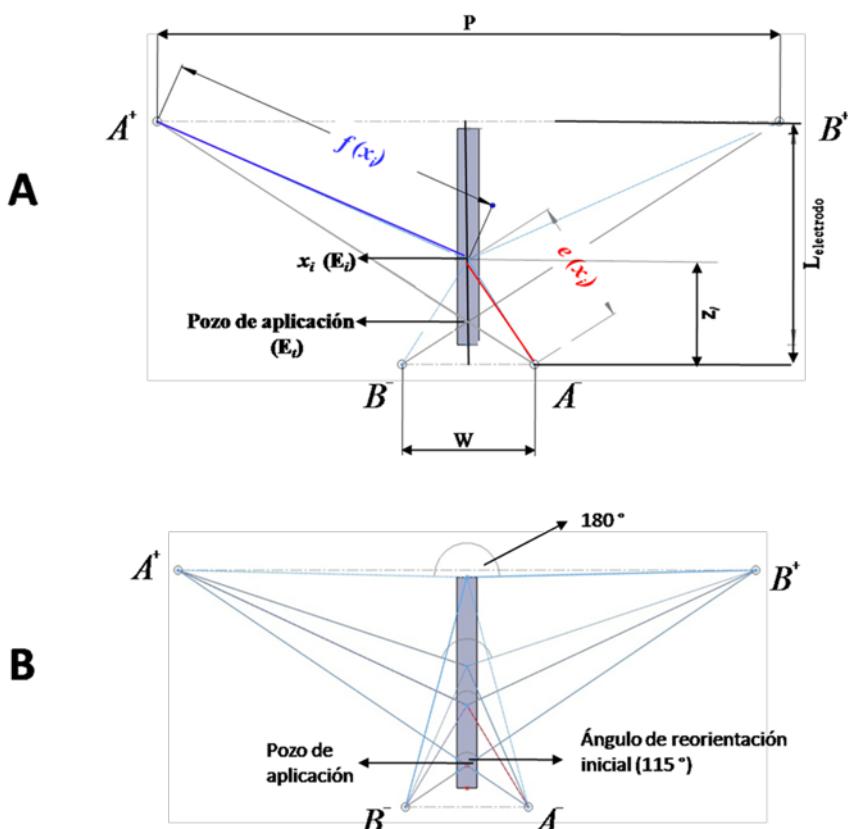
$$V_c = a_t \cdot \frac{V_t}{l_t} \quad (4)$$

Como el campo eléctrico es homogéneo en cualquier punto de la minicámaras CHEF,  $E_c = \frac{V}{d}$ , ( $d$ : distancia entre los electrodos opuestos de ambas cámaras). Pero el de la minicámaras TAFE varía a lo largo del gel según la distancia recorrida por la corriente a través de él.<sup>4</sup> Por tanto, la ec.4 toma

la forma:

$$E_c \cdot d_c = \left( \frac{\alpha_t \cdot d_t}{l_t(x_i)} \right) \cdot E_t \quad (5)$$

Siendo  $l_t(x_i)$  el valor de la distancia recorrida por la corriente entre ambos electrodos pasando por el punto  $i$  donde se encuentra la molécula  $x$  después de cada pulso (Fig. 2A) y  $E_t$  es el campo eléctrico inicial en la minicámaras TAFE.



**Fig.2. A)** Esquema de la distancia que recorre la corriente entre los electrodos de la minicámaras TAFE.  $e$ : la distancia que recorre la corriente entre el electrodo negativo y la posición ( $x_i$ ) de la molécula  $x_i$ .  $f$ : la distancia que recorre la corriente entre la posición ( $x_i$ ) de la molécula  $x_i$  y el electrodo positivo.  $W$ : la distancia entre electrodos negativos.  $P$ : la distancia entre electrodos positivos.  $L_{electrodo}$ : la altura entre los electrodos opuestos. **B)** Esquema de la variación del ángulo de reorientación a lo largo del gel en la configuración TAFE.

La distancia  $l_t(x_i)$  se calculó en función de la posición de la molécula en el gel, tomando en cuenta las razones trigonométricas entre la ubicación de los electrodos y el gel en la minicámaras TAFE (Fig. 2A). Resultando que:

$$f(x_i) = \sqrt{\left(\frac{P}{2}\right)^2 + (L_{electrodo} - z_i)^2}, \quad e(x_i) = \sqrt{\left(\frac{W}{2}\right)^2 + z_i^2}, \\ l_t(x_i) = e(x_i) + f(x_i).$$

Según el diseño mecánico de las minicámaras CHEF y TAFE,  $a_t = 7,1 \text{ cm}$ ,  $d_c = 11,3 \text{ cm}$  y  $d_t = 10,4 \text{ cm}$ .<sup>(4)</sup> Sustituyendo estos valores, así como la expresión de  $L_t(x_i)$  en la ec.5, se obtiene:

$$E_c = \frac{6,53}{e(x_i) + f(x_i)} E_t$$

(6)

La ec.6 expresa la relación entre los campos eléctricos de ambas minicámaras y la variación del campo eléctrico en la minicámara TAFE. Siendo  $E_t$  el valor inicial del campo eléctrico ( $E_t$  se tomó como 10 V/cm).

### Supuestos teóricos para modelar el gradiente de ángulo existente en la minicámara TAFE

En la minicámara TAFE  $d_{xk}$  (ec.2) no es constante a lo largo del gel porque tanto el campo eléctrico como el ángulo de reorientación ( $\alpha$ ) varían en esa misma dirección (Fig. 2B). Hasta el momento no se ha descrito la forma geométrica de las líneas de fuerza del campo eléctrico en la minicámara TAFE y en consecuencia no se conoce cómo varía  $\alpha$ . Se consideró que el valor de  $\alpha$  depende de la posición de la molécula en el gel y del ángulo de reorientación inicial ( $ang_{ini}$ ):

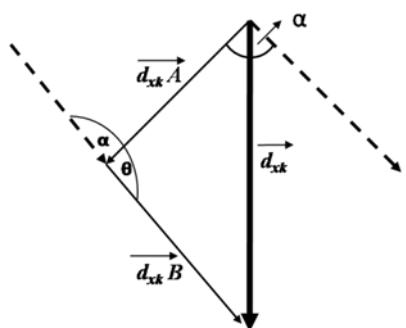
$$\alpha = m \cdot (posición)^n + ang_{ini} \quad (7)$$

donde:

$$ang_{ini} = 115^\circ$$

m y n son números reales.

Teniendo en cuenta las relaciones trigonométricas que se establecen entre la descomposición de  $d_{xk}$  en la dirección neta de migración (Fig. 3) y aplicando la ley de los cosenos se obtuvo la ec.8.



**Fig. 3.** Esquema de la descomposición de la migración por pulso  $\overrightarrow{d_{xk}}$  en la dirección neta de la migración en el gel de la minicámara TAFE.  $\overrightarrow{d_{xk}(A)}$  y  $\overrightarrow{d_{xk}(B)}$ : distancias migradas por el ADN en las direcciones A y B del campo eléctrico,  $\alpha$ : ángulo de reorientación,  $\theta$ : ángulo comprendido entre los lados  $\overrightarrow{d_{xk}(A)}$  y  $\overrightarrow{d_{xk}(B)}$ .

$$d_{xk}^2(TAFE) = (d_{xk} A)^2 + (d_{xk} B)^2 - 2d_{xk} A \cdot d_{xk} B \cdot \cos\theta \quad (8)$$

Asumiendo que  $|d_{xk} A| = |d_{xk} B|$ , la ec. 8 queda escrita como:

$$d_{xk}^2(TAFE) = 2(d_{xk} A)^2 - 2(d_{xk} A)^2 \cdot \cos\theta, \text{ por lo que:}$$

$$d_{xk}^2(TAFE) = 2(d_{xk} A)^2(1 - \cos\theta) \quad (9)$$

$\theta = 180^\circ - \alpha$  (Fig. 3), por tanto la ec.9 quedó escrita:

$$d_{xk}(TAFE) = \sqrt{2(d_{xk} A)^2[1 - \cos(180^\circ - \alpha)]} \quad (10)$$

Por suma vectorial (Fig. 3) se estableció la relación

$$\overrightarrow{d_{xk}} = \overrightarrow{d_{xk}(A)} + \overrightarrow{d_{xk}(B)}$$

De ahí que:  $|\overrightarrow{d_{xk}}|^2 = |\overrightarrow{d_{xk}A} + \overrightarrow{d_{xk}B}|^2$ . Por tanto:  $d_{xk}^2 = (d_{xk}A)^2 + 2(d_{xk}A)(d_{xk}B) + (d_{xk}B)^2$ , que se puede escribir también como:  $d_{xk}^2 = 4(d_{xk}A)^2$ , aplicando la raíz cuadrada se tiene:

$$d_{xk} = 2(d_{xk}A) \quad (11)$$

Sustituyendo la ec.11 en la ec.10, se tiene:

$$d_{xk}(TAFE) = \sqrt{d_{xk}^2[1 - \cos(180^\circ - \alpha)]}$$

Luego, volviendo al supuesto inicial, y sustituyendo  $d_{xk}$  de la ec. 2 en la ec.11 se obtiene una expresión para describir la migración por pulso (ec.12) y la migración total (ec.13) de las moléculas de ADN lineal en las minicámaras TAFE:

$$d_{xk}(TAFE) = \sqrt{vr_x \cdot tp_{xk} \cdot \Gamma(tp_{xk} - tr_x) + vm_x \cdot (tp_{xk} - tr_x) \cdot [1 - \Gamma(tp_{xk} - tr_x)]^2 [1 - \cos(180^\circ - \alpha)]} \quad (12)$$

$$D_x(TAFE) = \sum_{k=1}^n [d_{xk}(TAFE) \cdot Np_k] \quad (13)$$

### Los experimentos para estudiar la migración del ADN en la minicámara TAFE

Las muestras de ADN cromosómico de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 196-2 ( $\alpha$ , his-6, suministrada por M. Luzzati, Francia) intacto e inmovilizado, fueron preparadas mediante el método no enzimático previamente descrito.<sup>9</sup> Las separaciones de las moléculas del ADN se realizaron en la minicámara TAFE del Sistema Guefast 06®. Se seleccionó este microorganismo para evitar el uso de endonucleasas de restricción a la hora de obtener el cariotipo. Las electroforesis se realizaron a 20 °C en minigeles de agarosa al 1,5 %, la minicámara TAFE se llenó con 920 mL de la disolución estabilizadora TBE 0,5 X (Tris 44,5 mmol/L, ácido bórico 44,5 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8,3, con una conductividad de 632  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ). Las muestras de ADN se colocaron una a una en el transcurso de una electroforesis: después de colocar una muestra en el primer pocillo del gel, se aplicó un número determinado de pulsos eléctricos  $Np$  (Tabla 1). Se detuvo la corrida y posteriormente, se colocó otra muestra en el pocillo adyacente. Luego, se aplicó el mismo  $Np$  empleado anteriormente y así sucesivamente hasta colocar todas las muestras y someterlas a electroforesis en el mismo gel. De manera que el tiempo de electroforesis aplicado a cada una de ellas fue disminuyendo. Se probaron dos condiciones de tiempo y número de pulsos. Se colocaron 16 muestras en cada gel. Cada condición de electroforesis se repitió al menos tres veces.

**Tabla 1. Condiciones de electroforesis aplicadas para estudiar la migración de las moléculas de ADN lineal de *S. cerevisiae* en la minicámara TAFE**

Potencial eléctrico (V/cm)	$Tp^1$ (s)	$Np^2$	$Np$ total <sup>3</sup>
10	22	50	800
10	18	300	4800

<sup>1</sup>Tiempo de pulso.

<sup>2</sup>Número de pulsos aplicados entre una muestra y la siguiente.

<sup>3</sup>Total de pulsos aplicados a la primera muestra del gel.

### Método empleado para evaluar la ecuación que predice la migración de las moléculas de ADN en el sistema miniTAFE

El valor de campo eléctrico (E) se estimó en función del valor del campo eléctrico inicial y la posición de las moléculas en cada punto del gel (ec. 6). Los cromosomas de *S. cerevisiae* 196-2 seleccionados para este estudio fueron 250, 270, 315 y 440 kb. Las migraciones experimentales obtenidas aplicando las condiciones descritas (Tabla 1), se grafican en un sistema de ejes cartesianos en función de sus correspondientes migraciones teóricas según la ec.13. Para aceptarla, los pares de puntos se ajustan a una recta que debe tener pendiente igual a 1 e intercepto igual 0 con un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ . Las funciones lineales se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados y se determinó el coeficiente de correlación entre ambas variables. Se excluyeron del análisis los datos de migración experimental que resultaron ser ‘valores extremos’ (‘outliers’). Se considera ‘valor extremo’ a los que están fuera del intervalo  $\bar{X} \pm 3S$ . Para identificarlos, se empleó el método de re-muestreo “dejando uno fuera” (“leave one out”),<sup>(10)</sup> este consiste en extraer un punto de los datos experimentales (se calcula la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar ( $S$ ) de los restantes datos y se verifica que el valor de la migración del punto excluido se encuentra dentro del intervalo definido.

### Validación de la ecuación que predice la migración de las moléculas de ADN en el sistema TAFE

Para determinar la forma óptima de la ecuación que describe el ángulo de reorientación en la minicámara TAFE (ec.7) se consideran distintas combinaciones de “ $m$ ”, “ $n$ ” y “ $ang_{ini}$ ”. Con cada una de estas, se calculan las migraciones teóricas, las cuales se grafican en función de las migraciones experimentales correspondientes (medidos sobre el gel), y se ajustan los datos a una función lineal. La combinación que generó la mejor linealidad entre las variables fue optimizada empleando el método de Levenberg-Marquard,<sup>11</sup> el cual está basado en un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados.

Las predicciones de las migraciones de las moléculas de ADN lineal en la minicámara TAFE, realizadas con la ec.13, también se validaron mediante el método “dejando uno fuera”<sup>10</sup>. La ec.13 se consideró válida si la eficiencia de predicción (datos que están dentro del intervalo  $\bar{X} \pm 3S$ ) fue mayor del 80 %.

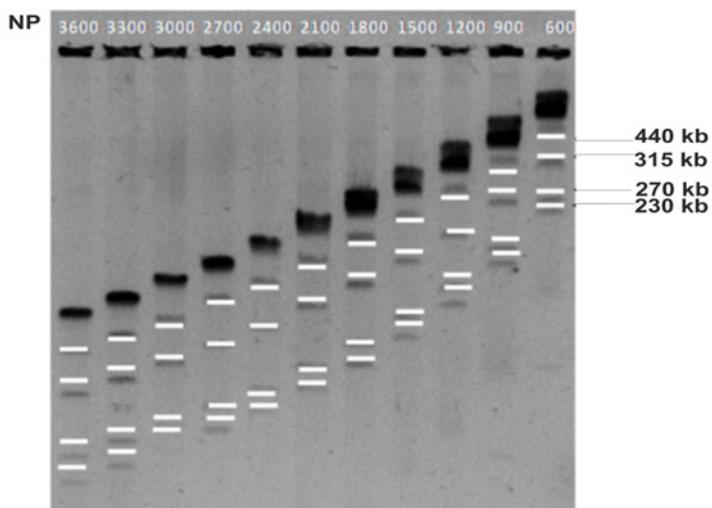
Software utilizado para corregir y validar la ecuación de la migración del ADN en la minicámara TAFE

Los algoritmos para modificar, simular y validar la ec.13 en la minicámara TAFE se programaron en MatLab (Versión 7.0.4 para Windows). Las funciones lineales se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados y la prueba estadística empleada para analizar los resultados fue *t*-student para muestras independientes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación preliminar de la exactitud las predicciones realizadas con la ec.13, se realizó de manera visual comparando los patrones de bandas virtuales y reales de las moléculas de ADN cromosómico de 230, 270, 315, y 440 kb de *S. cerevisiae*. De esta forma se comprobó que coincidían en cantidad de bandas resueltas (4 bandas) y además tenían similar resolución (Fig. 4).

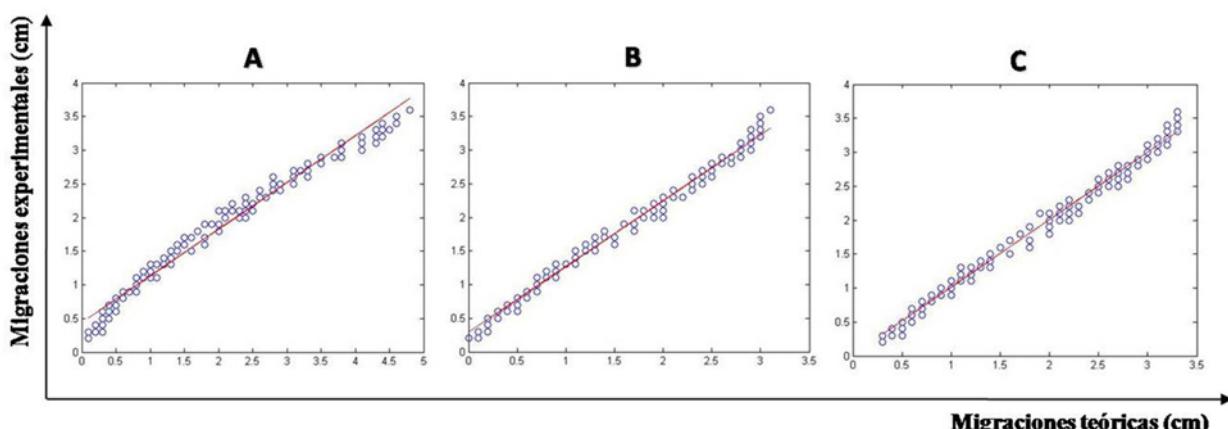
En algunos carriles (ej.  $N_p=2100, 2400$  y  $3000$ ) existe superposición completa entre las bandas de los patrones virtuales y reales. En este rango de tallas estudiado se encuentra el mayor por ciento de los fragmentos que se generan del genoma bacteriano cuando estos son digeridos con enzimas de restricción.



**Fig. 4.** Cariotipo Virtual (blanco) y experimental (negro) de las moléculas de ADN de *S. cerevisiae* obtenidas en la minicámaras TAFE. La electroforesis fue realizada a 10 V/cm, agarosa 1,5 %, Tp: 18 s, Np 600-3600. Las migraciones virtuales de los cromosomas fueron estimadas empleando la ec. I3.

#### Validación de las modificaciones propuestas

Con un tamaño de muestra de  $n = 254$  valores de migración se evaluó la correspondencia (a un nivel de significación de 0,05) entre las migraciones teóricas y las experimentales, para  $\text{ang}_{\text{ini}} = 115^\circ$ ,  $m$  y  $n = 1$  (ec.7). Los datos se ajustaron a una línea recta de pendiente  $a_1 = 0,68$  y un intercepto  $a_0 = 0,43$  (error estándar de la media  $E_s = 0,02$ ). La correlación entre las migraciones fue positiva ( $r = 0,28$ ) (Fig. 5A). Este no se consideró como un buen ajuste pues sólo el 27,8 % de los valores caían dentro del intervalo definido ( $\bar{x} \pm 3s$ ).



**Fig. 5.** Las migraciones teóricas y experimentales de las moléculas de ADN de *S. cerevisiae* obtenidas en el gel de la minicámaras TAFE. La variación de  $\alpha$  fue estimada empleando la ec.7 con los valores  $\text{ang}_{\text{ini}} = 115^\circ$ ,  $m$  y  $n = 1$  (A) o con la ec.14 (B y C). Los datos teóricos fueron estimados empleando las ecuaciones.13 (A y B) 15 (C).

Aunque el valor reportado para  $\text{ang}_{\text{ini}}$  es de  $115^\circ$ <sup>(4)</sup> el método de optimización utilizado arrojó que la combinación de “ $m$ ”,  $\text{ang}_{\text{ini}}$  y “ $n$ ” que generó mejor linealidad en la ec.7 fue:  $m = \frac{1}{1,6}$ ,  $n = 3,1$  y  $\text{ang}_{\text{ini}} = 125^\circ$ . Esta diferencia en cuanto al valor de  $\text{ang}_{\text{ini}}$  pudiera ser explicada porque

al ser colocado el gel dentro de la cámara con un marco de acrílico, este accesorio funciona como un dieléctrico, por tanto puede desviar la orientación de las líneas de fuerza del campo eléctrico, lo que tiene a su vez un efecto modificador sobre el valor de  $\alpha$ . Por tanto la ec.7 quedó formulada como:

$$\alpha = 125 + \frac{(posición)^{3,1}}{1,6} \quad (14)$$

Empleando la ecuación 14, nuevamente se evaluó la correspondencia entre las migraciones teóricas y las experimentales. El nuevo ajuste mostró una correlación de  $r = 0,98$ , pendiente  $a_1 = 0,97$  e intercepto  $a_0 = 0,25$  (error estándar de la media  $Es = 0,009$ ) (Fig. 5B). Estos valores resultaran mejores que los obtenidos en el ajuste anterior, la pendiente se acercó más a uno y el intercepto más a cero, en este caso, el 72 % de las migraciones teóricas estuvieron dentro del intervalo definido ( $\bar{X} \pm 3S$ ).

No obstante, el valor del intercepto ( $a_0 = 0,25$ ) implicó que la ec.13 subestimó la migración total de las moléculas. Probablemente esto se debió a que el centro geométrico de la minicámara TAFE no coincidía con el centro del campo eléctrico. Por tanto, se adicionó 0,25 cm al valor de la  $D_x$  calculada por dicha ecuación y se obtuvo:

$$D_x(TAFE) = \sum_{k=1}^n [d_{xk}(TAFE) \cdot Np_k] + 0,25 \quad (15)$$

La evaluación de la correspondencia entre las migraciones predichas con la ec.15 y las migraciones experimentales se recalcularon y graficaron (Fig. 5C). Los datos ajustaron esta vez a una recta de pendiente  $a_1 = 0,97$  e intercepto  $a_0 = 0,020$  ( $Es = 0,001$ ), el coeficiente de correlación entre las variables fue de  $r = 0,99$  para un nivel de significación de 0,05. Además, el 86,7 % de las migraciones predichas estuvieron dentro de los intervalos  $\bar{X} \pm 3S$  de sus correspondientes migraciones experimentales. Este resultado demostró que las correcciones introducidas en la ecuación 15 mejoraron las predicciones realizadas con la ecuación 13.

Los resultados obtenidos con la ec.15 permiten el diseño y establecimiento de los protocolos de trabajo en la minicámara TAFE, con el consecuente ahorro de tiempo y reactivos. Aunque para generalizar el modelo y que sea utilizado en la obtención de los pulsotipos de un mayor número de microorganismos, es necesario ampliar los estudios empleando diferentes condiciones de temperatura, campo eléctrico, porcentaje de agarosa y estudiar la migración de moléculas de ADN de otras tallas. De esta manera, se pondría a disposición de cualquier Sistema de Salud el uso de la minicámara TAFE para la realización de control epidemiológico mediante la obtención de información del genoma de los microorganismos causantes de brotes infecciosos de forma rápida, reproducible, económica y confiable.

## CONCLUSIONES

En este trabajo, se obtuvo un modelo que predice la migración de las moléculas de ADN entre 230 y 440 kb en la minicámara TAFE del sistema Guefast 06®. El modelo obtenido predice con una eficiencia del 86,7 % las migraciones de las moléculas que se resuelve en la minicámara TAFE. Como en este sistema los patrones de bandas que se obtienen son más nítidos que los del sistema CHEF, la minicámara TAFE se convierte en una opción más atractiva a la hora de seleccionar un sistema de Electroforesis Campos Pulsantes para estudiar el genoma de patógenos microbianos.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada en parte por el Centro de Neurociencias de Cuba y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT, México).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nasonova ES. [Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and applications]. *Tsitologiiia* 2008; 50(11): 927-35.
2. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 1986; Dec; 234(4783): 1582-5.
3. Gardiner K, Laas W, Patterson D. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Somat Cell Mol Genet*; 1986; Mar;12(2): 185-95.
4. Riverón A.M. Pulsed Field Gel Electrophoresis chambers, accessories and methods of use for the separation of DNA molecules. United States patent and Trademark Office Pre-Grant Publication patno:US20070102298. 2007.
5. Lopez-Canovas L, Riveron AM, Garrido Y, Corrales F, Aguila A, Cardenas Y. Adapting to contour-clamped homogeneous electric field minichamber technology the PulseNet protocols to resolve XbaI-DNA fragments of *Salmonella* serotype Braenderup. *Anal Biochem* 2009; May; 388(2): 339-41.
6. Lopez-Canovas L, Bravo L, Herrera J, Riveron AM, Javer E, Sanchez A, et al. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006; Jul; (14): 2857-64.
7. Herrera J. Minicámaras de Electroforesis de Campos Pulsantes para tipificar cepas bacterianas en estudios de epidemiología molecular. [Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias de la Salud]. La Habana, Septiembre; 2007.
8. Riveron AM, Herrera JA, Lopez-Canovas L. Chamber with modifiable inner width for performing transversal alternating field electrophoresis in variable numbers of minigels. *Electrophoresis*. 2004; Jun; (12): 1765-71.
9. Leon K, Riveron AM, Arencibia O, Lopez-Canovas L. Zinc-imidazole negative staining of chromosomal-sized DNA molecules in agarose minigels. *Anal Biochem*. 2010; Jul; 402(1): 96-8.
10. Grabowski T, Jaroszewski JJ, Sasinowska-Motyl M. Leave-one-out procedure in the validation of elimination rate constant analysis. *Arzneimittelforschung*. 2012; Dec; 62(12): 682-9.
11. Wilamowski BM, Yu H. Improved computation for Levenberg-Marquardt training. *IEEE Trans Neural Netw*. 2010; Jun; (6): 30-7.