

HARDWARE ESPECIALIZADO PARA EL CONTROL AUTOMATICO DE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSANTE DE CONFIGURACION HEXAGONAL DE ELECTRODOS

J. A. Herrera, L. Ruiz, L. López-Cánovas, O. Arencibia y A. M. Riverón.

Departamento de Biología Molecular. Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 1ro de septiembre de 1993.

RESUMEN. La electroforesis de campo pulsante es una de las técnicas más prometedoras para la separación de cromosomas humanos intactos. Durante la electroforesis es importante el control exacto del tiempo de aplicación de cada campo eléctrico, en la dirección dada y la determinación de la cantidad de conmutaciones realizadas. El uso de técnicas de computación es conveniente para combinar la fiabilidad y la simplicidad. En el presente trabajo se presentan y discuten los resultados sobre un sistema que incluye una cámara electroforética (modelo hexagonal) con enfriamiento, conectada a un sistema de imposición de voltajes que genera campos homogéneos, controlado por una microcomputadora mediante una tarjeta de interfaz multitarea diseñada. Esta interfaz está preparada para el control automático de los parámetros del sistema antes mencionado y trabaja simultáneamente con otros equipos de laboratorio de Biología Molecular.

ABSTRACT. Pulsing field gel electrophoresis is one of the most promising techniques for intact human chromosome separation. Both, precise control of the duration of the applied electrical pulses and counting of generated pulses are important during electrophoresis running. The use of computer techniques is convenient to combine reliability and simplicity. A versatile electrophoretic system has been developed. It is composed by a conditioned electrophoretic chamber (CHEF model), managed by a computer controlled voltage clamp unit. A designed multipurpose interface card makes the connection between the computer and the voltage clamp unit. This interface card is prepared for automatic control of the system parameters and it is able to control other Molecular Biology devices at the same time.

INTRODUCCIÓN

La separación e identificación de cromosomas humanos intactos es una tarea de actualidad y que de resolverse, facilitaría la realización de mapas genéticos, la obtención de sondas y la implementación de un nuevo procedimiento para el diagnóstico de alteraciones cromosómicas, entre otras.

La técnica más prometedora para lograr este objetivo es la electroforesis de campo pulsante. Ella utiliza la propiedad de las moléculas de ADN de experimentar reorientaciones en presencia de campos eléctricos en distintas direcciones y las separa en virtud de que el tiempo consumido en ese proceso es dependiente de la talla molecular.¹

De las numerosas variantes²⁻⁷ que se han diseñado, el modelo hexagonal con campos homogéneos fijados en el contorno permite obtener patrones electroforéticos rectos y brinda una capacidad de separación adecuada.

Para la realización exitosa de la electroforesis es necesario controlar un conjunto de parámetros tales como: el tiempo de aplicación de los pulsos, la cantidad de estos a aplicar, la duración del tiempo total de la electroforesis, la temperatura a la cual se realiza y otros.

La complejidad del equipamiento necesario para llevar a cabo esta técnica es considerable y no siempre se puede lograr la precisión requerida. Sin embargo, el control por computadora de los parámetros de la electroforesis logra combinar estas cualidades: sencillez y confiabilidad.

Con esta finalidad, se diseñó una tarjeta de interfaz para microcomputadoras IBM o compatibles que posee los elementos necesarios para el control de una unidad de imposición de voltaje a una configuración hexagonal de electrodos.

Esta tarjeta posibilita que pueda desarrollarse un paquete de programas que controle simultáneamente más de un equipo de Biología Molecular.

Descripción del trabajo

El conjunto consta de las partes siguientes:

1. Cubeta de electroforesis, piso con electrodos dispuestos hexagonalmente y accesorios.
2. Sistema de enfriamiento y recirculación.
3. Sistema de imposición de voltajes y fuente de poder.
4. Interfaz para computadora IBM.
5. Paquete de programas de control.

La cubeta fue construida de material plástico y tiene un piso con una distribución de electrodos hexagonal, según el diseño propuesto por Chu y col.³ que garantiza, en combinación con el *hardware*, la aplicación de los campos eléctricos homogéneos durante la electroforesis. Se construyeron también, los elementos necesarios para la preparación y manipulación de las muestras.

El sistema de recirculación y enfriamiento es el que garantiza la estabilidad de la temperatura. Consta de un serpentín ubicado en una cámara inferior, por el que pasa una mezcla refrigerante impulsada por un criostato. Esta mezcla mantiene constante la temperatura de la solución de trabajo que es recirculada por una bomba peristáltica.

La unidad de imposición de voltaje es un equipo electrónico capaz de distribuir a cada uno de los electrodos de la cubeta el conjunto de voltajes necesario para la obtención del campo eléctrico homogéneo (Fig. 1). El voltaje primario se obtiene de una fuente de poder comercial y la aplicación de los campos es indicada por la computadora a través de las señales de control.

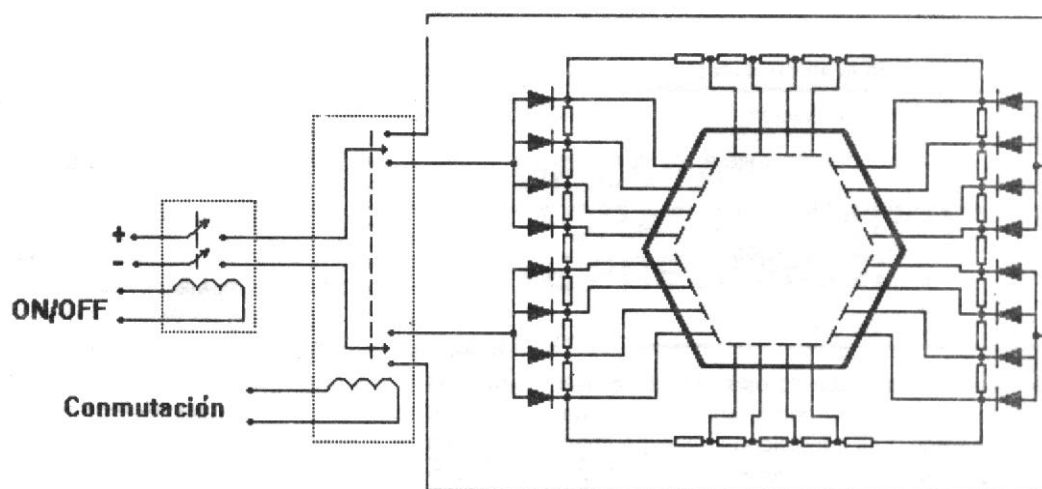


Fig. 1. Sistema de imposición de voltaje modelo hexagonal.

La comunicación de la computadora con la unidad de imposición de voltajes se realiza a través de una tarjeta de interfaz (Fig. 2) que se conecta al *bus* IBM a través de los *slots* de expansión que a tal efecto, brindan las microcomputadoras.

La tarjeta posee un reloj de 1 MHz y 6 contadores de 16 bits, lo que permite programar los tiempos de conmutación desde fracciones de segundo hasta días con una precisión de microsegundos.

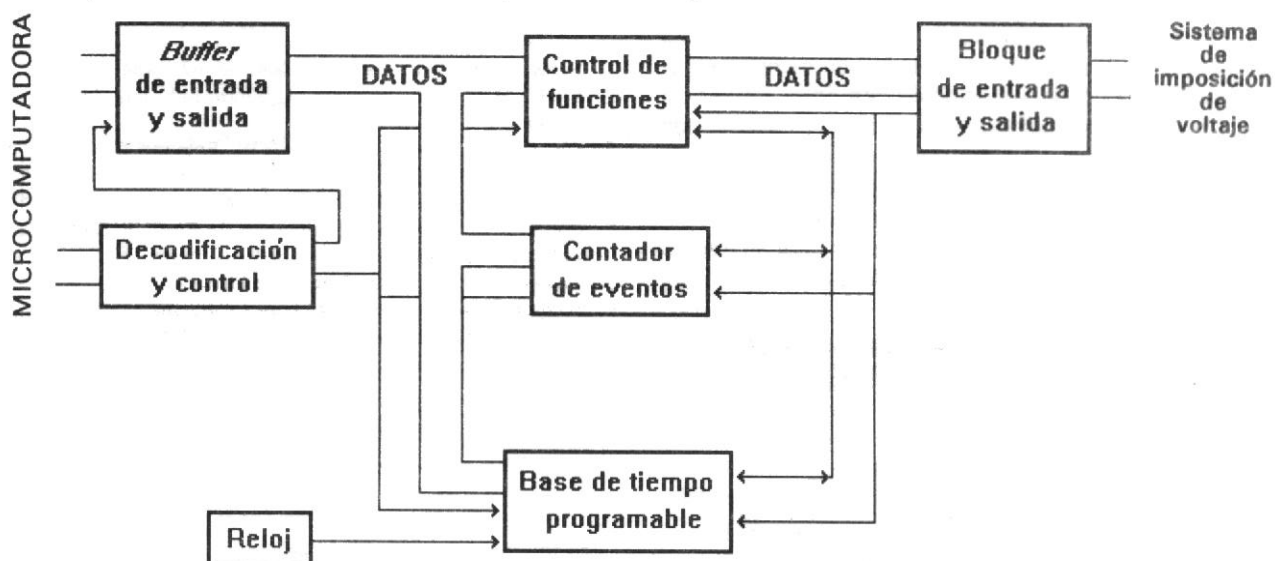


Fig. 2. Esquema del *hardware* para el control de la electroforesis.

La tarjeta de interfaz una vez programada, genera de forma autónoma la señal que controla la alternancia de los campos en la cubeta. La atención de la tarjeta se realiza por interrupción y puede ser reprogramada en tiempo real (Tablas I y II). La interfaz puede servir además, como elemento de control de otros equipos relacionados con la Biología Molecular, especialmente diseñados para intercambiar un protocolo con ella.

La electroforesis es controlada por un programa de computación desarrollado en TurboPascal para ser ejecutado sobre MS-DOS. Este programa prepara inicialmente la interfaz según los parámetros suministrados por el usuario y posee un módulo residente en memoria que controla de forma independiente el funcionamiento de aquella. De esta forma, se permite el uso de la computadora con otros programas.

Para evitar que posibles fallas en la operación del sistema pudieran impedir la terminación de un experimento, se resguardan las condiciones de la electroforesis cada cierto tiempo, lo que permite reanudarla aunque fuera interrumpida.

Comprobación experimental

El funcionamiento correcto tanto del *hardware* como del paquete de programas fue comprobado experimentalmente. Con este fin, se programaron diferentes condiciones de corri-

da del programa y se determinaron los tiempos de conmutación con ayuda de un osciloscopio y del reloj interno de la computadora. Se observó la conmutación real de los campos en la cubeta de electroforesis y se determinó el tiempo real de corrida de la electroforesis.

TABLA I
Puertos de la tarjeta multitarea

Puertos	Dirección
8255	33B
PC	33A
PB	339
PA	338
ClkCounter (CC)	337
CC-C2	336
CC-C1	355
CC-C0	334
ClkBase (CB)	333
CB-C2	332
CB-C1	331
CB-C0	330

TABLA I
Líneas de control de la electroforesis

Línea	Definición
PBO	Control del alto voltaje.
PB1	Habilita IRQ3.
Out CB-C2	IRQ3, Conmutación de los campos.
PC3	Gate del <i>ClkBase</i> .

Asimismo, se preparó una electroforesis real de resultado previamente conocido y se comprobó la presencia del patrón electroforético esperado. Las condiciones del experimento fueron: tiempo de alternancia 100 s; duración 24 h; temperatura 20 °C. La electroforesis se realizó a 165 V en agarosa al 1,5 % con solución TBE 0,5x. Las muestras de levadura *S. cerevisiae* fueron preparadas según Riverón y colaboradores.⁸

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tiempos determinados con el osciloscopio coincidieron con el de conmutación que brinda la tarjeta. Esto coincidió además, con el análisis visual del cambio de campos en el sistema de imposición de voltaje. Por otra parte, el tiempo real de la electroforesis coincidió con el programado en los experimentos anteriores.

Se pudo observar que el patrón que se obtiene con el sistema es el clásico descrito para la levadura *S. cerevisiae*, sin distorsión de las bandas (Fig. 3). Los hechos anteriores abogan a favor del buen funcionamiento del sistema diseñado y construido.

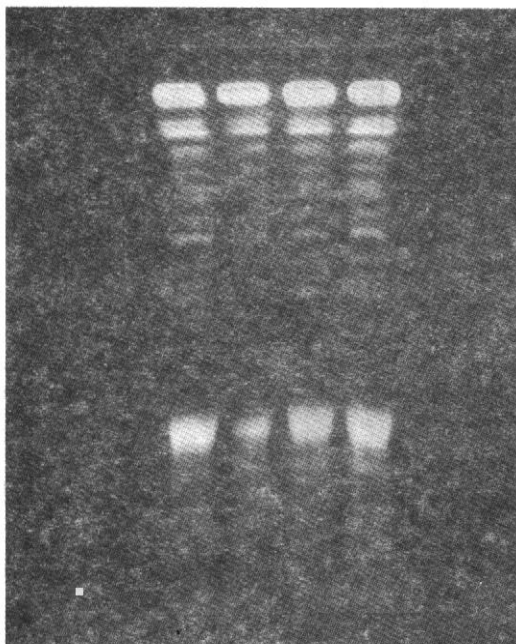


Fig. 3. Patrón electroforético de la *Saccharomyces cerevisiae* obtenido con el sistema descrito.

La capacidad de controlar simultáneamente la electroforesis de campo pulsante y otro equipo aplicado a la Biología Molecular (Diagnogen), fue corroborada, comprobándose además, que ambos equipos pueden trabajar en estas condiciones, sin dificultad ni interrupción alguna.

CONCLUSIONES

Se diseñó y construyó una tarjeta interfaz para microcomputadoras IBM o compatibles, que permite el control de una unidad de imposición de voltaje a una configuración hexagonal de electrodos y que hizo posible implementar un paquete de programas que controla simultáneamente varios equipos aplicados a la Biología Molecular. El sistema posibilita además, que ese control de los parámetros de la electroforesis, se realice mediante procesos sencillos que brindan a su vez, resultados precisos.

AGRADECIMIENTOS

A María Dolores Noa por la ayuda técnica prestada en la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Schwartz D.C. and Cantor C. *Cell.*, **37**, 67, 1984.
2. Lai E., Birren B.W., Clark S.M. Simon M.I. and Hood L. *Biotechniques*, **7**, 1, 1989.
3. Chu G.F., Vollrath D. and Davis R.W. *Science*, **234**, 1582, 1986.
4. Carle G.F. and Olson M.V. *Nuc. Acids Res.*, **12**, 5647, 1984.
5. Bancroft I. and Wolk P. 1988. *Nuc. Acids Res.*, **16**, 7405, 1988.
6. Gardiner K., Laas W. and Patterson D. *Somatic Cell Molec. Genet.*, **12**, 185, 1986.
7. Heller C. and Pohl F.M. *Nuc. Acid Res.*, **18**, 6299, 1990.
8. Riverón A. M., Higginson D., López-Canovas L., Pérez G, Garcia H.M., Reyes M. and Manresa R. *Studia Bioph.*, **133**, 73, 1989.