(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 334 978**

(51) Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01942956 .2**
(96) Fecha de presentación : **07.06.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1291649**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

(54) Título: **Cámaras de electroforesis de campos pulsantes, accesorios y procedimiento de empleo para la separación de moléculas de ADN.**

(30) Prioridad: **07.06.2000 CU 135/00**
27.12.2000 CU 306/00

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.03.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.03.2010

(73) Titular/es: **Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC)**
Avenida 25, nº 15202
Esquina a 158 Cubanacan, Playa
Ciudad de la Habana 12100, CU

(72) Inventor/es: **Riverón Rojas, Ana María;**
López Canova, Lilia;
Arencibia Díaz, Óscar;
Herrera Isidrón, José Alfredo;
Pérez Pérez, Gabriel;
Orozco Orozco, Esther;
Canino Ramos, Carlos Alberto;
Batista Santiler, Luis Mariano;
Gigato Pérez, Regnar;
Ruiz Esquivel, Leonardo;
Noa Blanco, María Dolores y
Javert Higginson, Elisa

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Cámaras de electroforesis de campos pulsantes, accesorios y procedimiento de empleo para la separación de moléculas de ADN.

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de la Biología Molecular y, en particular, se refiere a cámaras de electroforesis de campos pulsantes de los sistemas Campo Eléctrico Homogéneo con Contornos Fijados (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) (CHEF) y Electroforesis de Campo Alternativo Transversal (Transversal Alternating Field Electrophoresis) (TAFE). La presente invención se refiere también al uso de estas cámaras para la separación de moléculas de ADN y a un procedimiento para la selección de las condiciones de electroforesis empleando dichas cámaras.

Antecedentes de la invención

La electroforesis de campos pulsantes (ECP) data de 1984, cuando Schwartz D. C. y Cantor C. (Cell, 37, 67-75, 1984; Patente de Estados Unidos Nº 4.473.452) observaron que las grandes moléculas intactas de ADN se resolvían en los geles de agarosa en patrones de bandas mediante la aplicación de pulsos eléctricos que alternaban periódicamente su dirección de aplicación, la que formaba un cierto ángulo en relación con el gel. Los autores también determinaron que la separación de las moléculas dependía esencialmente de la duración de los pulsos eléctricos. Con posterioridad, se determinó que la geometría de las líneas de fuerza de los campos eléctricos alternantes, la intensidad de los mismos, la temperatura experimental, la fuerza iónica de la solución tampón y la concentración del gel de agarosa eran factores importantes que influían en la resolución que podía alcanzarse entre las moléculas de ADN (Birren B. y Lai E. Academic Press. Nueva York, 1993, pp 107, 111, 129, 131, 135; López-Cánovas L. y cols., J. of Chromatogr. A, 1998, 806, 123-139; López-Cánovas L. y cols., J. of Chromatogr. A, 1998, 806, 187-197).

La electroforesis de campos pulsantes brinda la separación de las moléculas de ADN en forma de patrones de bandas. Es decir, cada patrón se forma después de la electroforesis en las carrileras de los geles de separación. A su vez, en cada pocillo del gel se cargan bloques de agarosa que contienen las moléculas inmovilizadas de ADN, las que durante la electroforesis migran a lo largo de dichas carrileras y forman los patrones de bandas. Por tanto, este tipo de electroforesis tiene asociado un procedimiento para preparar moléculas de ADN intactas e inmovilizadas en bloques de gel. Esas moléculas pueden ser, o no, digeridas con endonucleasas de restricción antes de sufrir el procedimiento de electroforesis.

Se han desarrollado varios sistemas para realizar la ECP, los que se caracterizan por poseer cámaras en las cuales se colocan los electrodos en ordenamientos diferentes. Entre esas cámaras se encuentran las cámaras con ordenamiento de electrodos OFAGE ("Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis", Carle C. F. y Olson M. V. Nucleic Acids Res. 1984, 12, 5647-5664), CHEF ("Contour Clamped Homogeneous Electric Field", Chu G. Science 234, 1986, 1582-1585), TAFE ("Transversal Alternating Field Electrophoresis", Patente de Estados Unidos Nº 4.740.283), FIGE ("Field Inversión Gel Electrophoresis", Patente de Estados Unidos Nº 4.737.251 de Carle G. F. y Olson M. V) y las mini-cámaras MiniTAFE y MiniCHEF (Riverón, A. M. y cols., Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; Solicitud de Patente Europea EP 0 745 844).

Todos estos sistemas se caracterizan por poseer circuitos electrónicos para alternar los campos eléctricos y por poseer accesorios para preparar el gel. También existen accesorios para preparar las muestras. Ellos se diferencian entre sí por la complejidad de la electrónica para energizar los electrodos y cambiar la orientación del campo eléctrico. También se diferencian por su capacidad, o incapacidad, de brindar trayectorias rectas de migración en los patrones de bandas. La posibilidad de obtener trayectorias rectas de migración es esencial cuando se desean comparar los patrones que brindan numerosas muestras, mientras que la sencillez en la electrónica facilita y abarata la producción de los sistemas. De los sistemas mencionados, existen tres que brindan trayectorias rectas de migración de las moléculas:

1.- el sistema CHEF, que tiene electrodos que se fijan a potenciales eléctricos predeterminados, electrodos que están dispuestos en un contorno hexagonal alrededor de un gel submarino colocado horizontalmente;

2.- el sistema TAFE, en el cual se realiza la electroforesis en geles submarinos que se colocan verticales en la cámara y emplea campos alternantes transversales en relación con el gel; y

3.- el sistema FIGE, en el cual se realiza la electroforesis en geles submarinos horizontales que se colocan en cámaras convencionales de electroforesis, las que poseen dos electrodos donde se revierte periódicamente la orientación del campo eléctrico.

Estos sistemas tienen en común que en sus cámaras se coloca un gel que es atravesado simétricamente por las líneas de fuerza de los campos eléctricos que se generan en los electrodos que tienen polaridad opuesta en el ordenamiento de electrodos. En ese gel se cargan las muestras que contienen las moléculas intactas de ADN que son separadas. En

todas esas cámaras también existen zonas por donde pasan líneas de fuerza del campo eléctrico que no atraviesan el gel y por tanto no actúan sobre las moléculas. La zona de la cámara que contiene el gel y por la cual pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que actúan directamente sobre las moléculas se denominará aquí zona útil de electroforesis (ZUE), mientras que las zonas de la cámara por donde pasan líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan sobre las moléculas la denominaremos zonas no útiles de electroforesis (ZNU). Todas las cámaras existentes para realizar ECP poseen una región ZUE y regiones ZNU.

La cámara y la electrónica del sistema FIGE son sencillas y existen cámaras que permiten analizar simultáneamente numerosas muestras (hasta 96 muestras, empleando dos peines de 48 dientes en la Cubeta OnePhorAll Submarine Gel System de la Jordan Scientific, Catálogo BDH, 1997, Sección E pp 4-371), pero en las cámaras FIGE se observan fenómenos de inversión de la movilidad de las moléculas (Carle G. F., Frank M. y Olson M. V. Science, vol. 232, pp 65-68, 1986). Debido a la ausencia de teoría que prediga si estas moléculas de ADN invertirán su movilidad bajo determinadas condiciones experimentales en el FIGE, dicha inversión limita la utilización de dichas cámaras para analizar el tamaño de las moléculas de ADN que son separadas y comparar sus patrones de bandas. Por ejemplo, ese fenómeno puede provocar que dos moléculas de ADN de tamaños diferentes migren la misma distancia en el gel, lo que impide identificarlas, salvo que se recurra a procedimientos de hibridación con sondas. Hasta el momento, las dos únicas formas de estimar el tamaño de grandes moléculas específicas de ADN separadas en experimentos de ECP son:

1) comparar la distancia que migra la molécula en estudio con las distancias migradas por los marcadores de tallas y

2) emplear ecuaciones que describan las distancias migradas por las moléculas bajo condiciones diferentes de electroforesis y posteriormente reemplazar adecuadamente en ellas las distancias migradas y las variables experimentales.

En el FIGE los marcadores de talla también pueden sufrir fenómenos de inversión de la movilidad y como se mencionó no existe teoría capaz de predecir el momento y las condiciones en que una molécula invertirá su movilidad. Estas son limitaciones serias para emplear cámaras FIGE en estudios comparativos de numerosas muestras, como ocurre, por ejemplo, en la epidemiología molecular. Por esa razón, los sistemas más utilizados en la actualidad para comparar los patrones de bandas de múltiples muestras son el CHEF y el TAFE.

El sistema TAFE fue propuesto por Gardiner K. y cols. en su publicación en Somatic Cell Mol. Genet. 1986, 12, 185-195, lo denominaron inicialmente como "Vertical Pulsed Field Electrophoresis" (VPFE) y desarrollaron un aparato descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 4.740.283, con fecha 26 de abril de 1988. Ese sistema de separación de moléculas de ADN consiste en colocar verticalmente un gel de 10 x 7,6 x 0,6 cm (longitud x ancho x espesor) y disponer todos los electrodos paralelamente con las caras del gel y a todo lo ancho del mismo y de la cámara. En la cámara cada miembro de un par de electrodos de polaridades opuestas se coloca frente a una de las caras del gel. El cátodo se colocó en la parte superior y cercano al origen de migración y el ánodo alejado de este, al final del gel. Esta disposición de electrodos genera líneas isopotenciales a todo lo ancho del gel y un gradiente de potencial o campo eléctrico, donde las líneas de fuerza de dicho campo eléctrico atraviesan transversalmente al gel. Entonces, a lo largo del gel se obtiene un gradiente de intensidad de campo eléctrico y del ángulo que forman las líneas de fuerza de los dos pares de electrodos. Por esa razón, las moléculas son forzadas a migrar durante cada pulso a través del grosor del gel. La migración resultante ocurre en dirección vertical, hacia abajo. A pesar de la existencia de esos gradientes de intensidad del campo eléctrico, todos los puntos que se ubican a lo ancho del gel y a una misma altura con relación al plano que contiene ambos cátodos o ambos ánodos están a un mismo valor de potencial eléctrico (líneas isopotenciales), por lo que las moléculas de igual tamaño recorren distancias similares durante la electroforesis en todas las carrileras del gel y migran siguiendo trayectorias rectas hasta la misma altura en el gel, con independencia del pocillo en el cual fueron cargadas las muestras.

Basado en esos principios, la Beckman Instrument, Inc. (Beckman, The Geneline System Instruction Manual, ed. Spinco División of Beckman Instruments, 1988) construyó el equipo denominado "Geneline I", o "Transverse Alternating Field Electrophoresis System" conocido como TAFE. Este sistema emplea un gel de 11 x 7,2 x 0,6 cm (longitud x ancho x espesor), que se coloca entre pares de electrodos opuestos que están separados 20 cm. Con posterioridad, la Beckman Instrument, Inc. desarrolló el equipo "Geneline II" en el cual el gel se agrandó hasta 14,2 x 15 x 0,3 cm. El equipo Geneline II ya no se produce en la actualidad.

Para resolver las moléculas de ADN de gran tamaño en un patrón de bandas se requiere mucho tiempo en los equipos TAFE, Geneline I y Geneline II. Por ejemplo, el Geneline I requiere 24 horas para brindar un patrón de 11 bandas de los cromosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (moléculas menores de 1,6 Mb. 1 Mb = 10^6 pares de bases). Este mismo equipo puede necesitar hasta 90 horas para separar en 17 bandas las moléculas de ADN del genoma amibiano (Orozco E *et al*., Molec. Biochem. Parasitol. vol. 59, pp 29-40, 1993). Por otro lado, las cámaras TAFE requieren gran cantidad de la solución tampón para cubrir sus electrodos (por ejemplo, 3500 ml en la Geneline II) y durante la electroforesis la corriente es elevada y el calor que se genera puede ser grande. Si en los equipos TAFE se incrementa la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de polaridad opuesta se puede alcanzar el límite de corriente de la fuente de potencia. Por eso, los fabricantes recomiendan que el valor máximo de campo eléctrico aplicable sea de 10 V/cm (para fuentes cuyo limite de corriente es 0,4 amperios). Esto impide que se reduzca

la duración de las electroforesis mediante incrementos en la intensidad del campo eléctrico. Se ha planteado que el uso de voltajes elevados o altas temperaturas ensanchan y hacen difusas las bandas del patrón electroforético, lo que puede provocar ausencia de resolución entre las bandas. La ventaja del Geneline II es que permite analizar simultáneamente 40 muestras, lo que facilita el análisis comparativo de los patrones electroforéticos que brindan numerosas muestras.

El sistema CHEF fue desarrollado por Gilbert Chu (Science 1986, 234, 16, 1582-1585) con el siguiente fundamento: un campo eléctrico homogéneo se genera teóricamente por dos electrodos infinitos colocados paralelamente a cierta distancia. Para simular un campo homogéneo con electrodos finitos, otro grupo de electrodos se colocan en el mismo plano, a lo largo de un polígono cerrado, ya sea un cuadrado o un hexágono.

Se hace coincidir el eje X (y=0) del plano con un lado del polígono y se le aplica un potencial de cero voltios. El lado opuesto, a una distancia "A" (y=A) del origen de coordenadas y se polariza a un potencial "Vo". El resto de los electrodos se polarizan según V(y) = Vo y/A. De esta forma el potencial generado en el interior del polígono es igual al que sería generado por dos electrodos infinitos paralelos separados a una distancia "A". El ángulo de reorientación obtenido al permutar electrónicamente la polaridad entre dos pares de lados diferentes será de 90º para el polígono cuadrado y de 60º ó 120º para el hexagonal. Un procedimiento para fijar los potenciales deseados en los electrodos del CHEF es disponer de una serie de resistencias alambradas en forma de divisor de voltaje entre los potenciales V (0) = 0 y V(A) = Vo. De cada uno de los nodos, formados por la unión de dos resistencias, se obtiene el voltaje para polarizar un electrodo.

Basado en esos principios la firma BIORAD desarrolló los equipos CHEF-DR II, CHEF-DR III y CHEF Mapper (Patente de Estados Unidos 4.878.008, Patente de Estados Unidos Nº 5.084.157 y Patente de Estados Unidos 5.549.796). Este último es el sistema más avanzado. Para la imposición de los valores de voltaje en el arreglo hexagonal de electrodos emplea un divisor de voltaje, alambrado a un sistema transistorizado y amplificadores operacionales. Esa electrónica garantiza que los valores que se fijan en cada electrodo del arreglo hexagonal de la cámara sean siempre correctos.

Las dimensiones de la cámara de electroforesis del CHEF Mapper son 11,4 x 44,2 x 50,3 cm (alto x ancho x profundidad), pesa 10,2 kg y utiliza 2,2 litros de solución tampón. Este sistema emplea un gel de 14 x 13 cm (ancho y longitud) que se coloca concéntrico con el arreglo hexagonal de 24 electrodos cuyos lados paralelos están separados a 30 cm o más. El CHEF Mapper también es capaz de emplear un gel más ancho en el cual pueden cargarse hasta 40 muestras.

Los equipos TAFE y CHEF mencionados son capaces de separar electroforéticamente moléculas de ADN de talla cromosómica. Sin embargo, una desventaja común de los equipos CHEF y TAFE es que las cámaras son innecesariamente grandes y los geles innecesariamente largos, pues las dimensiones no han sido optimizadas, en particular cuando se emplean bloques delgados de muestras. Ha sido demostrado que el grosor de los bloques de agarosa que contienen las muestras de ADN influye en la resolución de las bandas, en el tiempo de electroforesis y en última instancia, determina el largo del gel que se utilice (López-Cánovas L. y cols. J Chromatogr. A, 1998, 806, 187-197). En ese trabajo se demostró que si se desea obtener una resolución "X" entre dos moléculas cualesquiera, ese valor se logra en menos espacio y menos tiempo si las bandas son delgadas o finas, lo cual se logra si los bloques de muestra son delgados también. Entre las consecuencias de emplear cámaras electroforéticas grandes están las siguientes:

I) Cuando se aplican campos eléctricos elevados se requiere emplear fuentes de potencia con elevada salida de potencia máxima. Esas cámaras poseen más de 20 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas, por eso, el campo eléctrico máximo que puede aplicarse en dichos equipos está alrededor de 10 V/cm.

II) Los experimentos son lentos en esas cámaras. Dos factores influyen: se emplean campos eléctricos muy bajos (alrededor de 6 V/cm) y muestras gruesas de más 0,1 cm de grosor. Por ejemplo, un experimento normal consume 24 horas para obtener un patrón electroforético de once bandas cromosomales correspondientes a moléculas de ADN menores de 1,6 mega bases (10^6 pares de bases) de *Saccharomyces cerevisiae* y hasta 90 horas para separar en 17 bandas las moléculas de ADN del genoma de *Entamoeba histolytica* (Orozco E *et al*, Mol. Biochem. Parasitol. 1993, 59, 29-40).

III) Los equipos no son económicos, pues utilizan grandes cantidades de reactivos costosos (tales como el Tris y la agarosa) y de muestra biológica. Esto último puede resultar prohibitivo para ciertas aplicaciones (por ejemplo en el diagnóstico clínico).

IV) Se genera gran cantidad de calor en la cámara de electroforesis cuando se aumenta la fuerza motriz de la electroforesis o campo eléctrico (la misma depende del voltaje aplicado en los electrodos y de la intensidad de corriente que pasa por la solución tampón). Si se desea aumentar el campo eléctrico (en aras de aumentar la velocidad de separación) tiene que hacerse a expensas de aumentar la diferencia de potencial en los electrodos y por ende la intensidad de corriente. Por efecto Joule se aumentaría la generación de calor en la cámara de electroforesis. Un aumento excesivo de la cantidad de calor ensancha y hace más difusas las

bandas y provoca distorsión del patrón electroforético llegando incluso al atrapamiento de las moléculas de ADN en los poros del gel y a una ausencia completa de migración.

No obstante, el gran volumen de solución tampón que emplean, estas cámaras tienen la ventaja que permite amortiguar cualquier turbulencia que se forme en la solución al ser re-circulada. De igual forma el gel queda tan separado de los electrodos que cualquier cambio local de conductividad en las cercanías de los electrodos, producto de la electrólisis se diluye y casi es imperceptible por el gran volumen de solución.

En 1995 se dieron a conocer los equipos MiniCHEF y MiniTAFE (Riverón A. M. y cols., Anal. Lett, 1995,28,1973-1991; Solicitud de Patente Europea EP 0 745 844) donde se realiza electroforesis de campos pulsantes a 8 muestras cargadas en un gel. Estos equipos superaron las deficiencias de los sistemas anteriormente mencionados. Tanto el MiniCHEF como el MiniTAFE emplean muestras delgadas de menos de 0,1 cm de grosor y permiten aplicar campos eléctricos más intensos brindando en los geles una resolución adecuada entre las bandas del patrón electroforético. Así, ellos permitieron resolver entre 4 y 5 horas los cromosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La separación entre sus electrodos opuestos es menor, lo que permite construir cámaras más pequeñas y emplear menos volumen de tampón para cubrir los electrodos y el gel (Riverón A. M. y cols., Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; Solicitud de Patente Europea EP 0 745 844, Bull. 1996/49). Por eso, en los MiniCHEF y MiniTAFE se genera poco calor, aún con campos eléctricos elevados. Las muestras cargadas en los geles de estos equipos emplean además poco material biológico (Riverón A. M. y cols., Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991). Ellos además ocupan poco espacio de laboratorio.

Los autores de estos equipos demostraron que la ECP puede realizarse en geles que no tienen que ser extremadamente largos. Por ejemplo, de 4 cm de longitud. Mediante el empleo de mini-equipos, López-Cánovas L. y cols (López-Cánovas L. y cols., J Chromatogr A, 1998, 806, 187-197) demostraron que bloques de más de 0,1 cm de grosor provocan la aparición de bandas gruesas que necesitan más tiempo y más longitud del gel para separarse. Sin embargo, el empleo de muestras gruesas no mejora en calidad el patrón electroforético, ni revela mayor cantidad de bandas.

Los mini-equipos propuestos por Riverón A. M. y cols. para realizar electroforesis de campos pulsantes poseen cámaras cuyos tamaños se calculan sobre la base de la existencia de otros equipos de dimensiones mayores (Riverón AM. y cols, Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; Solicitud de Patente Europea EP 0 745 844). Por tanto, pueden heredar defectos de los equipos a partir de los cuales ellos son diseñados. De hecho, los mini-equipos heredaron de las cámaras grandes un sistema abierto para preparar el gel y la ausencia de un sistema limitador de turbulencias.

En la solicitud de patente y los artículos relacionados no se mencionan los efectos que produce la reducción de los volúmenes del tampón ni del gel sobre el patrón electroforético, es decir, si esos volúmenes de tampón son suficientes para amortiguar las turbulencias del tampón durante la circulación, ni si las irregularidades en el gel y las diferencias en las dimensiones de los bloques influyen en la calidad del patrón de bandas que se obtienen.

Dichos problemas aumentan con la miniaturización, pues esta tiene asociado un efecto de magnificación de los errores de fabricación. Por ejemplo, si se formara un menisco de 0,1 cm de altura de un gel de 1 cm de espesor el error en la altura del gel sería de 10%, mientras que ese mismo error en un gel de 0,4 cm de espesor representa el 25%. Por tanto, la magnificación de los errores al miniaturizar el sistema puede convertirse en un factor crítico para obtener patrones de bandas reproducibles.

El parámetro relevante de los equipos de electroforesis de campos pulsantes es la separación entre electrodos, porque determina los valores de campo eléctrico que pueden aplicarse. También determina la fuerza motriz de las moléculas, las dimensiones de las cámaras, los sistemas que deben emplearse para homogeneizar las variables de la electroforesis, el ancho del gel de separación, el grosor de los bloques donde se incluirán las muestras y el ancho de cada muestra.

Si la separación entre los electrodos de polaridades opuestas no es óptima, por ejemplo, si es demasiado grande, asimismo serán poco óptimas las dimensiones del gel, de la cámara y la cantidad de muestras que pueda cargarse en esos geles. Si los bloques no son del grosor y tamaño apropiados, se puede desperdiciar gel y consumir mucho tiempo de electroforesis. Por otra parte, la forma y la distribución de las dimensiones de las cámaras así como la existencia de una región ZUE única determina que el consumo de reactivos en estas cámaras no sea óptimo. Por tanto, el objetivo deseable es disponer de cámaras que posean dimensiones óptimas, que permitan aplicar campos eléctricos elevados, que sus dimensiones internas varíen de acuerdo con la cantidad de muestras que analicen y que la duración de las electroforesis sea menor sin perder resolución ni la alta capacidad de análisis de muestras.

De los razonamientos anteriores puede concluirse que:

- Las grandes cámara de los sistemas actuales de ECP no son óptimas, por cuanto las distancias entre electrodos de polaridades opuesta son innecesariamente grandes y emplean la misma cantidad de reactivos, independientemente de la cantidad de muestras que serán estudiadas.

- Las dimensiones de las cámaras no son óptimas. Las dimensiones de las cámaras (alto, ancho y profundidad) no garantizan que la corriente en la cámara no sobrepase fácilmente los limites de salida de las fuentes de potencia de ECP y además las moléculas se separen rápidamente a campos eléctricos elevados.

- Para que pueda incrementarse el número de zonas ZUE deben realizarse modificaciones constructivas importantes en las cámaras existentes, las que pueden afectar el buen funcionamiento de los sistemas. Esto influye en la optimización del uso de reactivos.

Como se mencionó, las cámaras TAFE (Geneline I, Geneline II) y MiniTAFE poseen una plataforma de electrodos en la que se carga un gel (o dos geles en el Geneline II) cuya anchura es igual al ancho de la cámara y su altura depende de la separación entre los electrodos de polaridad opuesta (es decir, poseen una región ZUE). En el (los) gel (es), pueden cargarse tantas muestras como permita su ancho, el ancho de dichas muestras y la separación entre ellas. Los equipos con una región ZUE emplean un volumen constante de la solución tampón para cubrir sus electrodos.

Si el número de muestras que se deseara analizar simultáneamente sobrepasara la capacidad máxima de análisis de las ZUE de cualquiera de las cámaras mencionadas (por ejemplo, más de 8 en el MiniTAFE, más de 20 en Geneline I y más de 40 muestras para el Geneline II) sería necesario hacer varias electroforesis, por lo que los patrones de bandas no serían totalmente comparables. Por ejemplo, si se desea caracterizar el genoma de 100 aislados de un microorganismo determinado, ya sea que provengan de un cepario de la industria biotecnológica, de aislados de microorganismos infectando a personas, animales, o vegetales; entonces, esas tres cámaras presentan insuficiencias en su capacidad de analizar simultáneamente más de 8, 20 ó 40 muestras, respectivamente, o son insuficientes las posibilidades que brindan para ampliar su capacidad de análisis. Por eso, cuando es necesario realizar coelectroforesis de numerosas muestras para comparar los patrones de bandas que brindan las moléculas de ADN de dichas muestras, la capacidad máxima de análisis del TAFE (Geneline I, Geneline II) y MiniTAFE puede ser sobrepasada.

Una solución conocida, que aumentaría dos veces la capacidad de análisis de muestras de las cámaras mencionadas, es la implementada en la cámara FIGE OnePhorAll. Esta consistiría en colocar dos peines en el gel de la ZUE. Uno de ellos al inicio del gel y el otro a mediados del mismo. Sin embargo, en el sistema TAFE, las muestras cargadas en los pocillos que formarían ambos peines no estarían sometidas al mismo campo eléctrico ni ángulo de reorientación, por lo que, las moléculas de tallas similares migrarían distancias diferentes en el gel y los patrones de bandas no serían comparables.

Otra solución posible sería construir cámaras más anchas con el gel y zonas ZUE más anchas. Esa solución fue implementada en el Geneline II y supuestamente debería permitir analizar múltiples muestras (más de 40). Por eso, el Geneline II fue diseñado con una cámara poco profunda y ancha, pero alta y fue necesario colocar dieléctricos entre los electrodos y el gel para se obtuviera el gradiente de ángulo del sistema TAFE. Esos dieléctricos enlentecieron considerablemente las corridas. Además, la corriente eléctrica en la cámara depende directamente del área de sección transversal que ella ofrece al flujo de iones, por eso, en esas cámaras muy altas y anchas circula una corriente elevada, que supera las del Geneline I y VPFE inicial, por lo que aplicando voltajes bajos se alcanza antes el limite de corriente (Imax), o de potencia (Pmax) de la fuente de potencia. Por ejemplo, Macrodrive I, LKB: Imax= 0,4 A, Vmax= 500 voltios, Pmax=200 vatios; PowerPack 3000, Biorad, Cat. 1998-1999: Imax = 0,4 A, Vmax = 3000 voltios, Pmax = 400 vatios; Consort E802, Cat. BDH 1997: Imax = 2 A, Vmax = 300 voltios, Pmax = 300 vatios (Vmax, Imax y Pmax: límites de voltaje, corriente y potencia, respectivamente). Entonces, en ese tipo de cámaras no es posible incrementar la intensidad del campo eléctrico para reducir el tiempo de electroforesis. Los campos eléctricos poco intensos alargan innecesariamente la duración de los experimentos de ECP, lo que reduce el espectro de aplicaciones de esas cámaras en ramas de la ciencia y la técnica que requieren la consecución rápida de resultados. Además, ellas emplean mucho más volumen de reactivos que las existentes. De hecho, la Beckman Instruments ha interrumpido el sistema Geneline II.

Pudieran diseñarse cámaras MiniTAFE más anchas (máximo campo eléctrico aplicable de 25 V/cm para alrededor de 6 cm de ancho), pues ellas no son profundas ni altas. Por eso, su área de sección transversal puede aumentar hasta que brinde un valor de corriente eléctrica (I) que al aplicar un valor adecuado de E (por ejemplo 8-10 V/cm) aún no exceda los valores máximos de salida de las fuentes de potencia existentes. Esas cámaras emplearían además menos volumen de la solución tampón que las cámaras TAFE, Geneline I y Geneline II actuales. En ellas, se obtendrían en tiempo relativamente breve los patrones de bandas. No obstante, una región ZUE muy ancha emplearía un minigel muy ancho, el que presentaría dificultades para ser moldeado y manipulado. Por otro lado, pudieran emplearse varios minigeles, pero según la fórmula I, esa cámara no sería eficiente cuando se fueran a analizar pocas muestras. Cuando es necesario analizar pocas muestras, por ejemplo 8, se desperdicia mucha capacidad de análisis en los geles de los equipos TAFE, Geneline I y Geneline II, pues ellas poseen una región ZUE única y soportan 20 ó 40 muestras, respectivamente. Los reactivos empleados en los experimentos de ECP son caros. Los equipos aprovecharían eficientemente sus capacidades de separación de moléculas de ADN si el volumen de reactivos que cada vez emplearan las cámaras dependiera de la cantidad de muestras que se fuese a analizar en ese experimento. Eso es imposible en las cámaras de un solo ZUE pues emplean un volumen constante de reactivos.

Puede definirse el volumen de reactivos en exceso (ER %) que emplean las cámaras de un ZUE como

$$ER\ (\%) = 100{,}0 \cdot (Nt - N)/Nt \qquad (I)$$

donde:

Nt: Cantidad máxima de muestras que pueden cargarse en un minigel.

N: Cantidad de muestras realmente aplicadas en un experimento.

(Nt-N): Cantidad de muestras que no se cargaron en el gel.

La Tabla 1 muestra los valores de ER en los sistemas Geneline II y MiniTAFE. A medida que se emplean menos muestras ER crece en ambas cámaras, lo que pone en evidencia que ellas emplean reactivos en exceso cuando se aplican pocas muestras. Aunque el MiniTAFE (datos en la columna 2, Tabla 1) emplea menos volumen de reactivos que el TAFE, ese volumen tampoco varia con la cantidad de muestras analizadas. Por tanto, el volumen de reactivos que emplean las cámaras TAFE Geneline 1, Geneline 11 y MiniTAFE es constante e independiente de la cantidad de muestras que se va a analizar, lo que impide emplearlos óptimamente.

Además, la solución tampón se agota durante la electroforesis. Por eso, para diseñar óptimamente la forma y dimensiones de las cámaras es necesario conocer el tiempo que demora dicha solución en agotarse.

Por otro lado, las cámaras que separan moléculas de ADN empleando el sistema TAFE usan un gel que se coloca verticalmente y sus cátodos se ubican en su parte superior. Por eso, la dirección resultante de la migración es paralela a la del vector de la fuerza de gravedad. Para evitar accidentes con los electrodos al colocar el gel, el Geneline I posee dos plataformas desmontables de electrodos y el gel se coloca en la cámara antes de ubicar dichas plataformas.

TABLA 1

Exceso de reactivos (ER %) empleados en el TAFE Geneline II y en el MiniTAFE

N (Nº de muestras cargadas)	**TAFE GL-II** Bc = 3500	**MiniTAFE** Bc = 325
	ER (%)	ER (%)
1	97,5	87,5
2	95,0	75,0
3	92,5	62,5
4	90,0	50,0
5	87,5	37,5
6	85,5	25,0
7	82,5	12,5
8	80,0	0,0
9	77,5	--
10	75,0	--
11	72,5	--

12	70,0	--
13	67,5	--
14	65,0	--
27	32,5	--
40	0,0	--

-: Significa que el gel no tiene esos pocillos.
ER: Es el porcentaje de exceso de reactivos que se emplea
GL-II: Geneline II.
Bc: Volumen total, en ml, de solución tampón que llena la cámara.

Para implementar esa solución es necesario ubicar correctamente los electrodos en las plataformas y posicionar correctamente el gel con respecto a las plataformas. Sin embargo, este doble posicionamiento de los electrodos en las plataformas y de éstas con relación al gel, puede variar la disposición relativa entre el gel y los electrodos. Así, este aspecto debe mejorarse en el diseño de las cámaras.

Como se mencionó, en las cámaras existentes hay zonas por donde pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan directamente sobre las moléculas cargadas en el gel (las zonas no útiles para electroforesis, ZNU). Esas regiones no juegan un papel esencial en la separación de las moléculas de ADN.

Los mini-equipos reportados anteriormente tampoco son óptimos, pues no contemplan los aspectos necesarios para amortiguar oscilaciones en la solución tampón ni preparar geles sin irregularidades, ni bloques de muestra delgados de tamaños y formas similares.

Hasta la actualidad, se le ha prestado atención especial a lograr que los valores de voltaje con que se energizan los electrodos de las cámaras se mantengan sin variaciones durante el procedimiento de electroforesis. Esto es particularmente notorio en las cámaras de tipo CHEF, donde se requiere imponer valores dados de voltajes en cada electrodo del arreglo hexagonal. Sin embargo, no solo las variaciones en los valores de voltaje afectan la calidad de los patrones de bandas y la reproducibilidad de los experimentos. La reproducibilidad de los patrones de bandas también se afecta por los factores que modifican la homogeneidad de los valores de corriente eléctrica en la cámara y los factores que pueden distorsionar la forma de las líneas de fuerza del campo eléctrico.

Esos otros factores no han sido considerados en su totalidad en los sistemas de ECP. Por eso, los sistemas actuales pueden provocar distorsión del patrón de bandas. Esos problemas son especialmente críticos en mini-equipos que emplean geles. Ellos son:

- Las cámaras no poseen aditamentos simples para evitar turbulencias en la solución tampón durante la circulación del mismo entre la cámara y un intercambiador externo de calor.

- Los accesorios de preparar el gel de separación no contemplan aditamentos que impidan imperfecciones e irregularidades en el gel donde se realiza la electroforesis.

- Los accesorios para moldear las muestras incluidas en bloques de agarosa no contemplan que los bloques de muestra y pocillos deben tener dimensiones similares. Además, no existen aditamentos para lograr buen alineamiento de los bloques de muestra en el origen de migración.

- No existen aditamentos que garanticen el mantener los electrodos estirados.

Los aspectos mencionados afectan la obtención de patrones de bandas rectos y la reproducibilidad del patrón en las diferentes carrileras de un gel. En mayor grado afectan la reproducibilidad de los patrones de bandas en diferentes corridas electroforéticas con un mismo equipo u otro equipo.

Por otra parte, las cámaras de electroforesis de campos pulsantes se llenan con una solución tampón y ésta se hace circular entre ella y un intercambiador externo de calor. Esta solución es el medio a través del cual se establece el campo eléctrico o fuerza motriz a partir de los potenciales que se aplican en los electrodos. Los procedimientos

físico-químicos que ocurren en la solución durante la electroforesis: electrólisis, calentamiento por efecto Joule y variaciones de la concentración del tampón provocan falta de homogeneidad a través del volumen de la solución. La temperatura, concentración y otras variables afectan la viscosidad de la solución y el campo eléctrico que en ella se establece, afectando así la movilidad de las moléculas de ADN de forma diferente a través de toda la cámara cuando alguno de ellos varía incontroladamente. La electrólisis también afecta la conductividad del tampón. La solución que se encuentra en la cámara se intercambia constantemente con otro volumen termostatado a una temperatura fija. Esto se realiza con ayuda de una bomba peristáltica. De esa manera, se intenta que las características de la solución tampón se mantengan homogéneas y constantes durante toda la electroforesis. La velocidad de flujo con que se intercambia la solución debe garantizar el recambio total de todo el volumen contenido en la cámara en pocos minutos. Sin embargo, al inyectar la solución a cierta velocidad en la cámara, se producen turbulencias que provocan falta de homogeneidad local en el campo eléctrico aplicado, lo que afecta también la movilidad de las moléculas de ADN que se están separando.

El patrón de bandas resultante es dependiente de cambios en la conductividad de la solución tampón de la cámara y de la presencia de turbulencias en dicha solución. Esas turbulencias se acentúan cuando se hace circular el tampón a alta velocidad de flujo. Las turbulencias, remolinos u olas varían localmente la altura de dicha solución, modificando aleatoriamente y regionalmente los valores de resistencia eléctrica. Las diferencias de la corriente que circula entre distintas regiones de la cámara modifican la migración de las moléculas de ADN y puede generar patrones de bandas distorsionados.

El equipo CHEF MAPPER de Bio-Rad contempla en cierta medida este problema (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 4. Bio-Rad). La cámara de electroforesis CHEF de Bio-Rad posee dos cámaras pequeñas situadas bajo la cámara principal una al frente y otra detrás. Estas pequeñas cámaras se utilizan para recircular la solución tampón. La solución entra a la cámara principal a través de seis huecos horadados en el piso cerca del borde. Un deflector de flujo colocado frente a los huecos evita el movimiento del gel. Este sistema sin embargo no es muy eficiente para evitar la formación de turbulencias en la solución, en especial cuando se emplea una velocidad de flujo alta.

Ni el TAFE, ni los mini-equipos poseen ningún sistema que limite las turbulencias que pueden crearse en la solución tampón al recircular, lo cual es una desventaja. Es fácil intuir que la influencia dañina de las turbulencias se manifiesta más en cámaras pequeñas que llevan menos volumen de tampón. Por ejemplo, en la cámara del CHEF Mapper, que se llena con 2,2 l de solución tampón, esas turbulencias se amortiguan más fácilmente que en las minicámaras MiniCHEF y MiniTAFE que utilizan casi diez veces menos volumen.

Como se mencionó, las cámaras grandes de ECP amortiguan en cierta medida las oscilaciones en el tampón. Sin embargo, los mini-equipos de ECP son relativamente recientes, quizás por eso no se ha brindado atención especial al desarrollo de sistemas amortiguadores de turbulencias del tampón.

Los geles que utilizan los equipos CHEF y TAFE de dimensiones grandes así como el de los mini-equipos, se moldean en un molde de las dimensiones del gel, donde se coloca un peine y se vierte la agarosa fundida. Después se espera que la agarosa solidifique con el molde destapado. Sin embargo, debido a la tensión superficial de la agarosa liquida, esta sube por las paredes del recipiente donde se prepara el gel y forma meniscos. Esos meniscos se forman entre los pocillos donde se cargarán las muestras posteriormente o en las paredes del recipiente que se emplea para solidificar el gel. El molde para preparar el gel del TAFE posee una tapa, pero no posee aditamentos que eviten la formación de meniscos entre los dientes del peine. Los geles del CHEF y de los MiniCHEF y MiniTAFE no poseen tapa, por tanto en ellos se forman meniscos en los lugares anteriormente mencionados.

El gel es el medio en el cual ocurre la migración de las moléculas de ADN durante la electroforesis de campos pulsantes. La presencia de meniscos en los bordes laterales del gel, o entre los pocillos, modifica en esas regiones la resistencia eléctrica en el gel y por tanto la corriente eléctrica. Los cambios regionales de corriente en el gel afectan la migración de las moléculas de ADN en dichas regiones. Esos cambios son importantes cuando se forman meniscos entre los pocillos donde se cargarán las muestras. Los pocillos son el origen de migración de las moléculas, por tanto, si esas irregularidades introducen cambios en las velocidades de migración de las moléculas, el frente de migración de las moléculas se originará distorsionado. Entonces esa distorsión se mantendrá durante todo el procedimiento de electroforesis, obteniéndose al final un patrón distorsionado en esa carrilera del gel. Cualquier irregularidad del gel en otra región también afectará la migración de las moléculas que atraviesan dicha región.

Desde el punto de vista de reproducibilidad de los patrones de bandas, los accesorios que se emplean para preparar el gel y la manera de emplearlos son par lo tanto importantes. El diseño de sistemas eficientes para electroforesis de campos pulsantes se ha centrado fundamentalmente en brindar cámaras con diferentes configuraciones de electrodos y en brindar una electrónica adecuada para alternar los campos e imponer los voltajes. No se ha brindado atención especial a las propiedades de los accesorios para solidificar el gel.

Como se mencionó previamente, la electroforesis de campos pulsantes tiene asociada la metodología de preparación de moléculas intactas e inmovilizadas de ADN en bloques de gel. Para ello es necesario disponer de bloques de muestra para la formación de las mismas.

Los moldes existentes son los siguientes:

- un molde para formar bloques similares e independientes (Cantor C. R. y Schwartz D. C., Patente de Estados Unidos 4.473.452);

- un molde para formar tiras planas y largas que se cortan para formar bloques independientes;

- un molde para formar barras o varillas largas de agarosa que se cortan para formar bloques independientes (Birren B. y Lai E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: A practical guide, Academic Press, Nueva York, 1993, 29-30).

En esos moldes se generan bloques de muestra que por lo general son de dimensiones mayores que los pocillos del gel. Por eso, se recomienda que para que los bloques posean las dimensiones de los pocillos del gel es necesario cortarlos con un bisturí o cualquier otro implemento (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 40, Section 7. Números de Catálogo 170-3670 a 170-3673. Bio-Rad).

En las cámaras actuales (CHEF, TAFE, MiniCHEF y MiniTAFE), las desigualdades introducidas por los cortes en los bloques de muestras influyen en la calidad del patrón electroforético. Se conoce que el grosor del bloque de muestra que contiene la muestra de ADN influye en la resolución y el tiempo de electroforesis. Sin embargo, no se han estudiado detenidamente los efectos que provocan en los patrones electroforéticos las desigualdades en las formas y dimensiones de los bloques de muestra que se cargan en los pocillos del gel. Tampoco se han estudiado los efectos que provocan la mala alineación de los bloques de muestra en el origen de migración. En consecuencia, los investigadores han empleado los moldes formadores de bloques de muestra mencionados en el párrafo anterior, sin embargo, estos moldes no incluyen aditamentos de corte que permitan obtener bloques de muestra iguales respecto a su forma y dimensiones, las que además coincidan con las dimensiones de los pocillos del gel.

Si se considera que el patrón de bandas que se obtiene en cada carrilera del gel al final de la electroforesis depende de que todas las moléculas de una talla dada, salgan juntas y aproximadamente al unísono del bloque y del pocillo, es decir, que el frente de migración entre en el gel de separación formando una banda fina y recta, se comprende la importancia de los accesorios que se requieren para preparar los bloques de muestra y para alinearlos en los pocillos. Cuando el frente de migración se deforma en el origen de migración, el mismo se mantiene deformado durante toda la electroforesis, pues en la cámara no existe ninguna otra fuerza ni aditamento capaz de corregirlo. Los defectos al preparar los bloques de muestra y los problemas de alineación de los bloques en los pocillos son reproducidos exactamente en las bandas separadas en el patrón, pudiendo llegar a obtenerse bandas que no son rectas y que poseen ondulaciones.

En la Patente US. 5.457.050 de 1995 de GH Mazurek se reportó un molde para inmovilizar las células y tratarlas en el interior del mismo. Se propuso que ese molde pudiera ser desechable o reutilizable según el material empleado en su construcción. Además de que ese molde prolonga el tiempo de preparación de bloques de muestras, él tampoco tiene asociado un aditamento para cortar los bloques de muestras y así garantizar que en todos los pocillos del gel se depositen muestras similares.

Por otro lado, los equipos TAFE Geneline I y Geneline II fijan sus cuatro electrodos de alambre de platino entre las dos paredes paralelas de acrílico (Beckman, The Geneline System Instruction Manual, ed. Spinco Division of Beckman Instruments, 1988). Uno de los extremos de cada electrodo se extiende hacia la tapa de la cámara, más allá de la zona útil, hasta salir fuera del alcance de la solución tampón y de la cámara y se une, a través de un conector, con el generador de voltajes externo. Así se garantiza la continuidad eléctrica y la polarización correcta. Para que no forme parte del electrodo, la parte del alambre de platino que se prolonga hasta la tapa se cubre con un capilar plástico de elevada constante dieléctrica, aislándose así de la solución tampón. Como es conocido, los electrodos de platino sufren desgaste en la electroforesis de campos pulsantes. Por eso, el sistema que se emplea en el TAFE para colocar los electrodos tiene la desventaja que, a medida que se usa, el electrodo va perdiendo su tensión y se dobla u ondula por varias zonas, siendo difícil tensarlo nuevamente, pues se requiere desmontar el electrodo, lo cual no está al alcance del experimentador de manera sencilla.

Cuando los electrodos se doblan u ondulan, las líneas isopotenciales en el gel se distorsionan y provocan distorsión de las líneas de fuerza del campo eléctrico, provocando que las bandas no migren en un frente fino y recto.

Por otro lado, la forma de fijar los electrodos en los equipos TAFE representa un gasto excesivo de platino. Por ejemplo el equipo GeneLine I utiliza aproximadamente un metro de alambre de platino mientras que los electrodos activos solo requieren treinta centímetros. El equipo Geneline II tiene un diseño similar.

En el CHEF Mapper, los electrodos (en forma de J) se fijan en soportes de un material de elevada constante dieléctrica de forma que uno de sus extremos lo atraviese (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 4 y 65, Section 7. Números de Catálogo 170-3670 a 170-3673. Bio-Rad). Los soportes se insertan en el fondo de la cámara. De esta forma el alambre de platino atraviesa el piso de la cámara y puede unirse eléctricamente al circuito de imposición de voltajes. Para sellar el piso de la cámara se usa un sellante de silicona y anillos de goma que se comprimen con una tuerca. La forma de fijar los electrodos en los equipos CHEF ahorra platino al no tener que sacarlos por fuera de la solución. Sin embargo, no garantiza que los electrodos

mantengan su grado de tensión a medida que se usen y por tanto pueden provocar discretas deformaciones de las líneas de fuerza de los campos eléctricos.

Los equipos MiniTAFE y MiniCHEF reportados (Riverón A. M. y cols, Anal. Lett, 1995, vol. 28, 1973-1991; Solicitud de Patente Europea EP 0 745 844, Bull. 1996/49) extienden el alambre de platino después de los electrodos hasta sacarlos de la cámara por encima del nivel de la solución tampón. Así garantizan la comunicación necesaria entre los electrodos dentro de la cámara con los circuitos electrónicos exteriores que los polarizan. Las partes del alambre de platino que no funcionan como electrodos son cubiertos con mangueras de un material de elevada constante dieléctrica para evitar el contacto con la solución. Las cámaras de tipo TAFE utilizan electrodos que miden al menos todo el ancho del gel y quedan suspendidos entre las paredes laterales de las cámaras. Con el uso pierden tensión y se ondulan parcialmente lo que distorsiona los patrones de bandas. Además, esto significa un gasto adicional de platino que encarece estas cámaras.

Los equipos MiniTAFE separan los cromosomas de *S. cerevisiae* a campos eléctricos intensos (22 V/cm), brindando en los minigeles una resolución adecuada entre las bandas del patrón electroforético (Riverón *et al*., Analytical Letters, vol. 28, pp 1973-1991, 1995). Además, mediante su empleo pueden resolverse en 5 horas los cromosomas de la levadura *S. cerevisiae* a 8 volt/cm y 20ºC. La pequeña separación entre electrodos opuestos permite la construcción de cámaras pequeñas y el empleo de poco volumen de la solución tampón para cubrir los electrodos (350 ml). Cuando en los MiniTAFE se aplica un voltaje dado, es decir un cierto valor de intensidad de campo eléctrico "E", se genera menos calor que el que se generaría en los equipos TAFE donde se aplicara ese valor de "E". Las muestras cargadas en los minigeles de los miniequipos emplean poco material biológico y ellas se incluyen en bloques de agarosa de 0,1 a 0,05 cm de grosor, lo cual además brinda bandas más finas y reduce el tiempo que requiere la electroforesis para brindar un patrón dado de bandas (López-Cánovas *et al*., J Chromatography A, 806, pp 187-197, 1998). El tamaño de los minigeles depende de la separación entre los electrodos de polaridad opuesta. En los minigeles pueden aplicarse tantos bloques de muestras como sea posible cargar a lo ancho del mismo, por ejemplo para un gel de 4,0 x 4, 0 x 0,5 cm (ancho x alto x espesor) se pueden aplicar hasta 10 bloques de muestras de 2,5 mm de ancho, separadas 1 mm.

A pesar de las ventajas expuestas, los equipos mencionados poseen insuficiencias que limitan sus aplicaciones en el análisis de numerosas muestras. En particular, cuando entre un experimento y otro varía considerablemente la cantidad de muestras que se desean comparar o estudiar. Parte de esas insuficiencias se relacionan con la forma y la distribución de las dimensiones de la cámara y con la existencia de una región ZUE única.

Existen procedimientos para seleccionar las condiciones de corrida en equipos de ECP. Por ejemplo, el CHEF Mapper de la Bio-Rad posee una opción de autoalgoritmo y otra de algoritmo interactivo (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. 31-40 Números de Catálogo 170-3670 a 170-3673. Bio-Rad). Las dos opciones permiten calcular los tiempos de pulso, la duración de las rampas de tiempos de pulso, el ángulo de reorientación, el campo eléctrico y el tiempo óptimo de corrida para separar las moléculas de ADN de una muestra dada. A diferencia del autoalgoritmo en el que se asumen condiciones fijas para las variables, el algoritmo interactivo permite variar el tiempo, temperatura, concentración del tampón y el tipo y concentración de agarosa. Ambos algoritmos funcionan sobre la base de datos empíricos y teóricos colectados durante 5 anos de experiencias (Bio-Rad Catalogue. Life Science Research Products 1998/99. Bio-Rad Laboratories, 185). Sin embargo, los propios fabricantes recomiendan que al autoalgoritmo se le introduzcan tallas de ADN superiores e inferiores a las que se desean separar. También que se considere que si el rango de tallas que se introduce, como datos en el autoalgoritmo y en el programa interactivo, es grande los algoritmos pueden brindar resultados erróneos, tales como la inversión de la movilidad de las moléculas en el centro del gel.

Existen otras expresiones empíricas que brindan la duración de los pulsos eléctricos que separarían un grupo de moléculas cuyas tallas están comprendidas entre un valor dado y otro mayor llamado RSL (Resolution Size Limit) (Smith D. R. Methods I, 1990,195-203). Sin embargo, esa relación solo es válida en algunas condiciones experimentales y no predice la resolución entre dos moléculas cualesquiera. También existe una función que brinda las condiciones aproximadas de campo eléctrico y tiempo de pulso que separarían un grupo dado de moléculas (Gunderson K. y Chu G. Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 3348- 3354). Debe notarse que solo permite estimar aproximadamente esos dos valores, pero no brinda la migración de las moléculas en cualquier condición experimental.

A pesar de que existen múltiples estudios teóricos acerca de la reorientación de las moléculas de ADN durante la ECP (Noolandi J., Adv. Electrophoresis, 1992, 5, 1-57; Maule J., Mol. Biotech., 1998, 9, 107-126), ellos aún no han brindado un resultado práctico de utilidad en los laboratorios. Es decir, no han generado procedimientos que permitan que el usuario de la ECP seleccione fácilmente las condiciones que debe emplear en la separación de un grupo de moléculas que desea estudiar.

Las ecuaciones propuestas por López-Cánovas L. y cols. (López-Cánovas L. y cols, J. Chromatogr. A, 1998, 806, 123-139) para describir la migración de las moléculas de ADN en ECP tampoco han sido extendidas para seleccionar las condiciones experimentales que deben aplicarse en un equipo cualquiera cuando se varían el tiempo del pulso, el campo eléctrico y la temperatura.

Hasta el momento, las condiciones experimentales que se aplican en los equipos de ECP provienen más de la experiencia del usuario en el uso de los sistemas de ECP que de ecuaciones que describan la migración del ADN. No existe un procedimiento infalible que prediga cuáles tiempos de pulso y duraciones de los experimentos deben

emplearse cuando varían las variables de corrida. Tal procedimiento es particularmente importante cuando se trabaja con las mini-cámaras de los mini-equipos, pues en ellos se pueden emplear campos eléctricos intensos, lo que no es común en los restantes sistemas de ECP.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a cámaras de electroforesis de campos pulsantes de los sistemas Campo Eléctrico Homogéneo con Contornos Fijados (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) Electroforesis de Campo Alternativo Transversal (Transversal Alternating Field Electrophoresis) (TAFE), accesorios y procedimientos para su empleo.

Las cámaras de la invención son utilizadas para la separación de grandes moléculas de ADN mediante el empleo de electroforesis de campos pulsantes (ECP) en mini-equipos y minigeles, así como en cámaras que usan múltiples minigeles. Las cámaras, accesorios y procedimientos aquí propuestos poseen aplicaciones en la tipificación de ceparios biotecnológicos de la industria alimenticia, de ceparios de laboratorios de investigaciones y de ceparios de laboratorios clínicos microbiológicos. También poseen aplicaciones en estudios epidemiológicos moleculares de enfermedades infecciosas, así como en el estudio del origen de las contaminaciones en la industria biotecnológica. Pueden ser empleadas en la tipificación de bacterias resistentes a múltiples antibióticos, en la caracterización del genoma de especies vegetales, de mamíferos y del hombre y en el estudio de enfermedades hereditarias. En esta última aplicación pueden desarrollarse nuevos procedimientos rápidos y reproducibles para su control y diagnóstico.

La presente invención brinda cámaras de electroforesis de campos pulsantes de tipo CHEF y TAFE de dimensiones óptimas que permiten aplicar campos eléctricos elevados.

Permiten también realizar coelectroforesis en múltiples minigeles a numerosas o pocas muestras y reducir las duraciones de las electroforesis sin perder resolución entre las moléculas ni la alta capacidad de análisis de muestras.

En la invención se asume la existencia de sistemas para energizar los electrodos con los valores apropiados de voltaje en las cámaras de electroforesis de tipo CHEF y TAFE. Un sistema como el reportado por Maule (Maule J. y Green D. K. Anal. Biochem. 1990 191, 390-395) u otro similar es apropiado para la correcta polarización de los electrodos. También parte de la base de que se dispone de fuentes de potencia, intercambiador externo de calor, recirculador para termostatar la solución tampón en la cámara, así como los reactivos químicos y biológicos necesarios para llevar a cabo el procedimiento de electroforesis de grandes moléculas de ADN.

La invención aquí desvelada brinda:

Mini-cámaras de electroforesis de campos pulsantes (ECP) de los sistemas CHEF y TAFE con una zona útil de electroforesis (ZUE) única y en las que se han eliminado las zonas no útiles de electroforesis (ZNU). Las minicámaras permiten recircular la solución tampón a alta velocidad de flujo sin que se formen turbulencias en la cámara y separan las moléculas rápidamente en patrones de bandas que son reproducibles en todas las carrileras del minigel y entre electroforesis efectuadas en momentos diferentes.

Multimini-cámaras TAFE con la misma distancia entre los pares de electrodos opuestos de una minicámara, dos o más ZUE que incluyen un minigel cada una y sin zonas no útiles de electroforesis. Estas cámaras poseen una capacidad elevada de análisis de muestras y también pueden analizar pocas muestras sin perder su optimización ni la rapidez de análisis. En ellas se contempla que el gasto de reactivos dependa de la cantidad "N" de muestras que se desea analizar en cada experimento, que el usuario pueda variar la cantidad de regiones ZUE que empleará en cada experimento y que el tiempo de electroforesis sea pequeño.

Un conjunto de accesorios que limitan la formación de turbulencias en la solución tampón, permiten moldear minigeles de caras planas sin que existan irregularidades de ningún tipo en su superficie y formar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán cargados.

Procedimiento de empleo de las cámaras y accesorios de electroforesis de campos pulsantes que incluye además un procedimiento de calcular el tiempo de electroforesis para diferentes valores de campo eléctrico y temperatura en las cámaras.

En conjunto las cámaras, accesorios y procedimientos que son objetos de esta invención, permiten separar en minigeles, de manera rápida y reproducible, grandes moléculas de ADN, empleando agarosa, en un rango de concentraciones entre 0,5 y 1,5%. Más particularmente, las cámaras, accesorios y procedimientos de esta invención poseen las siguientes características distintivas:

Emplean minigeles rectangulares o cuadrados en los que pueden llegar a cargarse hasta 200 bloques de muestras. La cantidad de muestras depende del ancho del minigel, valor que a su vez depende de la distancia que separa los electrodos de polaridad opuesta en las cámaras de tipo CHEF y del ancho de las cámaras en las de tipo TAFE. La cantidad de solución tampón que emplean también depende de la separación entre los electrodos de polaridades opuestas y del ancho de la cámara.

Las cámaras brindan resultados reproducibles en virtud de que tanto las cámaras como los accesorios garantizan valores de corriente eléctrica homogénea en toda la solución tampón y buena alineación de los bloques de muestras en el origen de migración. También se garantiza que se mantenga el grado de tensión de los electrodos.

Las cámaras son capaces de separar rápidamente, al menos en 2,5 horas, a las moléculas de ADN de tamaños hasta 2 mega pares de bases.

Las cámaras poseen un procedimiento para calcular la duración de la electroforesis cuando se varia el campo eléctrico, la temperatura y la duración de los pulsos eléctricos que se aplicarán durante el procedimiento de electroforesis de las moléculas de ADN.

A.- *El cálculo de las dimensiones de los minigeles, las áreas de las cámaras y las cantidades de muestras que pueden cargarse en los pocillos*

Para llevar a cabo este cálculo nombraremos "d" a la separación entre los pares de electrodos de polaridades opuestas. Las dimensiones recomendadas para ancho y largo de los minigeles del CHEF (cm) y la base de la cámara donde se pone el arreglo hexagonal de electrodos y que posee una ZUE única y de la cual se han eliminado las ZNU son:

$$\text{ancho del minigel rectangular} = d / (2 \cdot \cos(30^{\circ})) = d / 1{,}732$$

$$\text{largo} = d \cdot \{1\text{-}1 / [2 \cdot \cos^2(30^{\circ})]\} = d / 3$$

$$\text{lado del minigel cuadrado} = d \cdot \{1\text{-}1 / [2 \cdot \cos^2(30^{\circ})]\} = d/3$$

$$\text{área de la base de la cámara} = [2 + (d/\cos(30^{\circ}))] \cdot [6 + d] = [2 + (d / 0{,}87)] \cdot [6 + d]$$

De la cámara se eliminaron las regiones ZNU debido a que ellas no juegan un papel esencial en la separación de las moléculas de ADN, determinándose que las paredes laterales de la cámara debían estar separadas un centímetro de los electrodos y que el sistema de limitación de las turbulencias en el tampón (que se explicará más adelante) debería ocupar 2 cm en cada lado, en la entrada y la salida del tampón. Esa consideración explica además los valores constantes de 2 y 6 de las fórmulas del área de la base de la cámara. Si acotamos "d" entre 6,2 cm y 15 cm, entonces:

- los anchos "a" del minigel rectangular están comprendidos entre 3,6 y 8,7 cm,
- los largos entre 2,1 y 5 cm,
- las áreas entre 7,6 y 43,5 cm^2,
- los lados del minigel cuadrado están comprendidos entre 2,1 y 5 cm,
- las áreas entre 4,4 y 25 cm^2,
- las áreas de la base de la cámara entre 111,3 y 404,1 cm^2.

El nivel del tampón en la cámara debe sobrepasar 0,3 cm al minigel, por tanto el volumen de tampón queda definido por

$$\text{volumen del tampón} = \{[2 + (d/\cos(30^{\circ}))] \cdot [6 + d]\} \cdot (0{,}3 + \text{grosor del minigel})$$

Si el grosor de los minigeles está entre 0,35 y 0,5 cm entonces el volumen de tampón estará entre 72,3 y 323,3 ml.

La cantidad máxima de bloques que puede cargarse en los minigeles queda definida según sus anchos "a" (en cm) como:

$$\text{cantidad de bloques a cargar en los minigeles} = (a - 0{,}2)/0{,}25$$

Estando la cantidad máxima en los minigeles rectangulares de 3,6 y 8,7 cm entre 13 y 34 bloques, respectivamente.

El largo (en cm) del minigel del TAFE tanto en las minicámaras con una ZUE única o ZUE múltiples (multiminicámaras) es:

$$\text{largo del minigel} = d \cdot \text{sen}\,(310)$$
$$= d \cdot 0{,}515$$

mientras que su ancho "a" es igual al ancho de la ZUE. Cuando las cámaras poseen una ZUE única el ancho de los minigeles se corresponde con el ancho de la cámara, mientras que cuando posee dos o más ZUE, la multiminicámara poseerá dos o más minigeles de ancho equivalente al ancho de cada ZUE.

El área (cm^2) de cada una de las paredes que sostienen el minigel y los electrodos está dada por

$$\text{área} = [2 + 1{,}4 \cdot\ d] \cdot [2 + 0{,}54 \cdot\ d] - 1{,}02 \cdot\ [1 + 0{,}54 \cdot\ d]^2$$

Si acotamos "d" entre 6,2 y 15 cm, entonces los largos de los minigeles del TAFE están comprendidos entre 3,2 y 7,7 cm en tanto el área de cada una de las paredes que sostienen el minigel y los electrodos estará entre 37,8 y 147,8 cm^2.

En las cámaras TAFE mientras menor es la distancia entre los pares de electrodos opuestos "d", menor será el área de sección transversal y por ende se podrán aplicar campos eléctricos mayores sin incrementos significativos de la corriente inicial ("I_0") y de la potencia en la cámara. Por tanto, para construir cámaras donde "L" (el ancho de la cámara o dimensión paralela a los electrodos) sea grande es conveniente que "d" sea pequeña. Esto garantiza que se puedan aplicar valores de "E" que separen rápidamente los cromosomas sin que ("I_0") exceda el umbral convenido de salida máxima de las fuentes convencionales de ECP.

Aunque las cámaras posean separación pequeña entre electrodos opuestos, solo serán óptimas las cámaras anchas capaces de soportar simultáneamente varios minigeles, los que puedan excluirse (o no) de los experimentos junto con el volumen correspondiente de tampón. La subdivisión del minigel ancho en varios minigeles más estrechos se logra eficientemente si la cámara se divide en varias regiones ZUE. Cuando en esos minigeles se cargan todas las muestras que ellos admiten, entonces esas cámaras trabajarán a su máxima capacidad y podrán analizar simultáneamente numerosas muestras. Sin embargo, se desperdiciaría capacidad de análisis y reactivos si solo se analizaran pocas muestras. Para evitarlo, es necesario que solo se activen las ZUE que se requieran y se excluyan del experimento las no empleadas. De esa forma, el volumen de reactivos que se emplee dependerá cada vez de la cantidad de muestras que se desea analizar y por tanto de la cantidad de regiones ZUE que se activen.

La cantidad máxima de muestras que se puede analizar simultáneamente en los minigeles del TAFE depende del tamaño y cantidad de ZUE, los que a su vez dependen del ancho máximo ("L") que puede tener la cámara. El ancho de la cámara determina la corriente que se extrae de la fuente de potencia con que se energizan los electrodos. Por tanto el factor limitante para construir cámaras TAFE anchas es la capacidad de salida de corriente y potencia de las fuentes de potencia de que se dispone. Por lo que conociendo las características de las fuentes de potencia, el ancho máximo que pudiera tener la cámara TAFE se puede calcular "*a priori*" a partir de ecuaciones que describan la corriente en las mismas.

Para obtener las ecuaciones que describan la corriente en la cámara se construyó una cámara TAFE con una distancia entre los pares de electrodos opuestos en el rango definido para las minicámaras TAFE y un ancho "L" de 316 mm. En esta cámara fueron eliminadas las zonas no útiles de electroforesis y se le diseñaron aditamentos para variar las dimensiones internas desde 7 cm hasta el ancho "L" de la cámara lo que permite disponer de "n" cámaras TAFE de diferentes anchos. Para obtener las ecuaciones, primero se ajusta la función que describe a la conductancia específica "ρ" ($mho \cdot cm^{-1}$) del tampón TBE 0,5X (1X TBE: Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH 8,3) en función de la concentración molar del Tris ([Tris]) y de la temperatura experimental "T" (ºC).

$$\rho = 5{,}190 \cdot 10^{-3} \cdot [\text{Tris}]^{0{,}8461} \cdot e^{0{,}02214 \cdot T} \qquad \text{(II)}$$

Se considera que la corriente inicial "I_0" (en amperios) en la cámara depende de la resistencia del electrolito, la que está dada por la relación entre la constante de la vasija "Cv" (en cm^{-1}) y la conductancia específica "ρ". La constante de la vasija depende de la separación entre los electrodos de polaridad opuesta y del área "A" (cm^2) de sección transversal que ofrece la cámara al paso de la corriente.

Ya que las cámaras no poseen formas geométricas perfectas porque fueron eliminadas las ZNU es necesario determinar las constantes de las vasijas (Cv = d/A) para anchos y formas diferentes. Para determinarlas se ideó el siguiente procedimiento:

- Se determina la constante de la celda de un conductímetro "Cv (cond)".
- Se llena la cámara de electroforesis con una solución de cualquier electrolito conocido que se mantiene a una temperatura fija.

- Se mide la conductividad de dicho electrolito empleando la celda calibrada del conductímetro "G (cond)".
- Se mide la conductividad del electrolito, conectando los electrodos de la cámara de electroforesis a los conectores de medición del conductímetro "G (cámara)".

Es fácil deducir que "Cv (cámara)" es:

$$Cv\ (cámara) = [G\ (cond) \cdot Cv\ (cond)\ lj/G\ (cámara) \quad (III)$$

Para cada una de las "n" cámaras TAFE de anchos "L_i" (donde "i" es un número entre 1 y "n") diferentes se determina "Cv ($cámara)_i$". Entonces puede obtenerse la función que relaciona "Cv" con "L":

$$Cv\ (cámara)_i = f\ (L_i) \quad (IV)$$

Entonces, en las cámaras de anchos "L_i", las resistencias ("Re_i") al paso de la corriente que brindan electrolitos de conductividad "p_j" están dadas por:

$$Re_i = Cv\ (cámara)_i/p_j \quad (V)$$

Desde los estudios iniciales de conductividad se conoce que al aplicar voltaje con una fuente de potencia de corriente directa, la corriente que puede medirse en un electrolito no depende solamente de "Re". En realidad, ocurre polarización del electrolito, lo cual reduce el valor del campo eléctrico y de la corriente que circula. Por eso, para poder diseñar cámaras TAFE de anchos variables es necesario disponer de las funciones que describen la atenuación del campo eléctrico que provoca la polarización del electrolito.

La atenuación del campo eléctrico en cámaras de electroforesis que tengan anchos y formas geométricas diferentes puede ser estimada si se conoce Re (ecuaciones II, IV y V) y se considera que la resistencia total (R) que se mide en la solución tampón cargada en la cámara puede modelarse como dos resistencias colocadas en serie, "Re" y "Rp".

$$R = Re + Rp, \quad (VI)$$

donde "Rp" juega el papel de resistencia adicional inducida por la polarización del electrolito. Entonces, de acuerdo con la ley de Ohm

$$V_{DC} = I_{DC} \cdot R \quad (VII)$$

donde el voltaje que se aplica con la fuente de corriente directa es V_{DC} y la corriente directa que se mide I_{DC}: Si se aplican valores crecientes de V_{DC} y se determina I_{DC} pueden calcularse los valores de "Rt" y estimar "Rp" a partir del conocimiento de "Re" (ecuación V) en esa cámara. De esa manera se puede obtener la función que relacione "Rp" con "Re" y con "V_{DC}"

$$Rp = f\ (Re, V_{DC}) \quad (VIII)$$

Mediante el empleo de las ecuaciones anteriores pueden ser predichas las corrientes iniciales ("I_0") que se obtendrían para voltajes V_{DC} en cámaras de diferentes anchos que contienen tampones de conductividades diferentes y en las que la temperatura de electroforesis pueden ser diferentes. Por tanto, para fuentes de electroforesis cuyas salidas de corriente, voltaje y potencia son conocidas, puede estimarse el ancho máximo que puede tener cada cámara que se emplee con cada fuente existente. Ese ancho es aquel que brinda valores de "I_0" y de potencia "P" que no sobrepasen los valores máximos de salida de la fuente. El voltaje que brinda ese "I_0" esa "P" es el voltaje máximo que puede aplicarse en dicha cámara.

Para diseñar multiminicámaras TAFE, además de poder predecir "I_0" hay que considerar el agotamiento del tampón. O sea, que los incrementos de corriente en la cámara producto del agotamiento de tampón, no sobrepasen los límites de corriente y potencia de la fuente de potencia durante el transcurso de la electroforesis. Por eso, hay que disponer de ecuaciones que describan el agotamiento del tampón en el tiempo. El tiempo de agotamiento del tampón debe depender al menos de "E". La ecuación para describir a la constante de agotamiento de la solución tampón ("k", en Ohm$\cdot t^{-1}$) puede ser obtenida partiendo del supuesto que cuando se aplica un voltaje "V_{DC}" (en voltios) la corriente "$I_{DC}t$" (en amperios) en cualquier momento de la electroforesis está dada por

$$I_{DC}(t) = V_{DC}/R(t), \quad (IX)$$

donde,

$$R(t) = R + kt \quad (X)$$

$$k = f(E) \quad (XI)$$

y "R" se calcula según la ecuación VI. Así, mediante el empleo de esas ecuaciones puede predecirse "I_0" y como varía la corriente durante la electroforesis, por lo que puede conocerse el momento de recambio de la solución tampón en cada experimento. Las ecuaciones pueden obtenerse empíricamente, cargando la solución tampón en la cámara, regulando la temperatura, aplicando el voltaje y monitoreando la corriente ("It") durante el tiempo ("t"). Con posterioridad se emplean procedimientos de regresión para el ajuste de las variables.

Utilizando la relaciones II a la XI se calcula el ancho máximo "L" de la multiminicámara TAFE el cual depende de la distancia entre electrodos "d", la conductividad "ρ" y la temperatura "T" del tampón así como del campo eléctrico aplicado y está limitado por la corriente "Imax" y potencia "Pmax" máximas de salida de la fuente de potencia que se utilice para energizarla. Es decir,

$$L = f(Imax, d, \rho, T, Emax) \quad (XII)$$

$$L = f(Pmax, d, \rho, T, Emax) \quad (XIII)$$

El ancho máximo "L" que puede tener la multiminicámara TAFE será el menor de los dos valores de "L" que se obtienen mediante las funciones XII y XIII.

En base a las ecuaciones XII y XIII y empleando fuentes de potencia de hasta 2 amperios y 300 vatios de corriente y potencia de salida respectivamente se calculó que pueden construirse multiminicámaras TAFE con un ancho "L" de hasta 50 cm. En dichas cámaras la distancia entre los pares de electrodos opuestos puede ser de hasta 15 cm y puede emplearse tampón TBE 0,5X a una temperatura máxima de 30ºC. Estas multiminicámaras se pueden subdividir en ZUE, que si para realizar la electroforesis son empleadas todas se pueden aplicar campos eléctricos de hasta 8 V/cm y si se inactivan algunas de las ZUE se pueden aplicar campos eléctricos de hasta 25 V/cm.

El número de ZUE puede variar entre 1 y 30.

El área del minigel del TAFE tanto en las minicámaras con una ZUE única o ZUE múltiples (multiminicámaras) es:

$$\text{área del minigel} = d \cdot \text{sen}(31^\circ) \cdot L/ZUE_{total}$$
$$= d \cdot 0{,}515 \cdot L/ZUE_{total}$$

el volumen de tampón en la cámara depende del ancho de la cámara que se seleccione y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{volumen del tampón} = [(2 + 1{,}4 \cdot d) \cdot (2 + 0{,}54 \cdot d) - 1{,}02 \cdot (1 + 0{,}54 \cdot d)^2] \cdot L \cdot ZUE_{act}/ZUE_{total}$$

donde,

ZUE_{act}: número de ZUE que están activas durante la electroforesis

ZUE_{total}: número de ZUE en las que está subdividida la cámara.

La subdivisión de las cámaras TAFE en ZUE aumenta su eficiencia, lo cual se evidencia si retomamos la fórmula I y definimos.

Bc: Volumen de reactivos en ml (de la solución tampón o agarosa) que requiere la cámara completa.

Bzue: Volumen de reactivos en ml que se requiere por cada ZUE donde pueden separarse un máximo de "NM" muestras.

Bnt: Cantidad de reactivos en ml empleados cuando se activa una cantidad dada de ZUE "Nzue". Bnt = Nzue · Bzue

Nt: Cantidad máxima de muestras que puede cargarse en las ZUE activadas Nt = NM · Nzue.

(Nt-N): Cantidad de muestras que no se cargaron en el experimento.

(Bnt/Nt): Volumen de reactivos empleados por cada muestra.

(Nt-N) · (Bnt/Nt): Volumen de reactivos en exceso cuando se cargan "N" muestras y es posible cargar "Nt" muestras.

Si el volumen de reactivos en exceso se relaciona con el volumen de reactivos que requiere la cámara completa ("Bc") y nombramos "ER" al resultado, se obtiene:

$$ER\ (\%) = 100{,}0 \cdot Bnt \cdot (Nt - N)/(Nt \cdot Bc) \qquad (XIV)$$

Si aplicamos la relación XIV a una cámara de cuatro ZUE, donde cada una requiere 325 ml de la solución tampón y admite un minigel que porta 13 muestras, obtendremos para "ER" los valores mostrados en la Tabla 2. En ese ejemplo, el comportamiento de "ER" va desde un valor máximo de 23,1% cuando "N" es 1, 14, 27 y 40 muestras hasta un mínimo cuando "N" es 13, 26, 39 ó 52 muestras (Tabla 2). Obsérvese que se propone que cuando solo se emplee una ZUE, las tres restantes se inactiven y ocluyan, por lo que, Bnt = 325 ml y Nt =13. Así deberá ser si solo se emplearan la primera y segunda miniplataformas; entonces Bnt = 650 ml y Nt = 26. Se procede de igual manera con las restantes miniplataformas. En las cámaras de una sola ZUE, como el Genline II, Nt = 40, Bc = Bnt = 3500 ml, mientras que en el MiniTAFE Nt = 8, Bc = Bnt = 350 ml. Por eso, Bc = Bnt y ER = (Nt-N)/Nt (Tabla 1). Por tanto, las cámaras deben estar subdivididas en varias regiones ZUE subdividiendo o no la plataforma de electrodos, pero sin perder la capacidad de efectuar coelectroforesis de la cantidad de muestras que se desee, ni gastar reactivos excesivamente, ni emplear más de una fuente de potencia.

En estas cámaras el volumen de reactivos ("Bnt" en ml) que se emplea durante cada electroforesis depende de la cantidad máxima de muestras que se vaya a analizar ("Nt") en cada experimento.

Todas las ZUE de una cámara TAFE deben activarse con una sola fuente de potencia y deben emplear un solo sistema para alternar los campos.

TABLA 2

Volumen de reactivos en exceso ("ER") en una cámara de cuatro ZUE que admite electroforesis de campos alternantes transversales (MultiMiniTAFE) en cuatro minigeles

Bc = 1300 ml							
ZUE 1 Nt = 13 Bnt = 325 N = 1..13		ZUE 2 Nt = 26, Bnt = 650 N = 14..26		ZUE 3 Nt = 39, Bnt = 975 N = 27..39		ZUE 4 Nt = 52, Bnt = 1300 N=40..52	
N	ER(%)	N	ER(%)	N	ER(%)	N	ER(%)
1	23,1	14	23,1	27	23,1	40	23,1
2	21,2	15	21,2	28	21,2	41	21,2
3	19,2	16	19,2	29	19,2	42	19,2
4	17,3	17	17,3	30	17,3	43	17,3
5	15,4	18	15,4	31	15,4	44	15,4
6	13,5	19	13,5	32	13,5	45	13,5
7	11,5	20	11,5	33	11,5	46	11,5
8	9,6	21	9,6	34	9,6	47	9,6
9	7,7	22	7,7	35	7,7	48	7,7
10	5,8	23	5,8	36	5,8	49	5,8
11	3,8	24	3,8	37	3,8	50	3,8

12	1,9	25	1,9	38	1,9	51	1,9
13	0,0	26	0,0	39	0,0	52	0,0

Si se considera que la fuerza motriz de la electroforesis la provee el campo eléctrico, que esta fuerza es muy superior a la de gravedad y que por su pequeña masa, las moléculas no pueden sedimentar por la acción de la fuerza de la gravedad; entonces es indudable que las moléculas siempre migrarán en la dirección de la resultante entre las líneas de fuerza de ambos campos eléctricos. Por tanto, es posible invertir el ordenamiento de electrodos. Es decir, los cátodos se pueden colocar en la parte inferior de la cámara y los ánodos en la superior, de tal forma que los bloques de muestras se cargan en la parte inferior del minigel y las moléculas migran en dirección contraria a la fuerza de la gravedad. Ese ordenamiento invertido lo denominaremos configuración TAFE invertida y facilita la colocación de los geles en el interior de la cámara a la vez que evita los errores del "doble posicionamiento" de los electrodos y del minigel.

Como resultado de la invención, se proveen cámaras de electroforesis del sistema TAFE en su versión MiniTAFE que son anchas y poseen multiplets zonas ZUE que pueden ser activadas o no a voluntad y energizadas con una sola fuente de potencia y en las que se eliminaron las regiones ZNU porque no juegan un papel esencial en la separación de las moléculas de ADN. Por tanto, en esas cámaras pueden colocarse multiplets minigeles y separar simultáneamente las moléculas de ADN contenidas en pocas o en gran cantidad de bloques de muestras; por ejemplo, en 10, 20, 30, 40 o más muestras diferentes.

Para llevar a cabo la separación de esas moléculas, dichas cámaras emplean la cantidad de reactivos que se requiere para analizar los "N" bloques de muestras, cuyas moléculas serán separadas en un tiempo "t".

La separación entre los electrodos de polaridad opuesta es la descrita para la minicámara TAFE, por eso separan las moléculas rápidamente.

Las cámaras son anchas, hasta donde lo permitan las ecuaciones II-XIII y los valores de salida máximos de las fuentes de potencia de ECP (véase el ejemplo en la Tabla 3), por eso son capaces de separar las moléculas contenidas en al menos 52 muestras de 2,5 mm de ancho.

Las cámaras poseen varias zonas útiles de electroforesis (ZUE), que pueden ser empleadas en los experimentos o pueden ser ocluidas e inactivadas y solo requieren una fuente de potencia y un sistema para alternar los campos eléctricos. Por eso emplean eficientemente los equipos.

La subdivisión de la cámara en varias ZUE simula un ancho variable y hace que "Nt" y "Bnt" varíen con la cantidad de ZUE empleadas en la cámara (véase en la Tabla 2 el ejemplo de una cámara de 4 ZUE). El volumen de la solución tampón se reemplaza según predicen las ecuaciones II, III, IV y V. Por eso pueden analizar muchas o pocas muestras empleando los reactivos eficientemente.

Las cámaras pueden construirse con la configuración TAFE convencional o configuración TAFE invertida y pueden ser de acrílico, teflón o cualquier otro material de elevada constante dieléctrica.

Las regiones que no son útiles en la electroforesis (ZNU) se ocluyen con piezas de la forma apropiada que se construyen con material de elevada constante dieléctrica, o se eliminan de las cámaras mediante cualquier procedimiento constructivo.

Pueden existir varias cámaras con las características mencionadas, las llamaremos tipo I y tipo II.

Las cámaras tipo I: Son las más simples y como todas estas cámaras poseen una distancia pequeña entre sus electrodos opuestos, son poco profundas, poco altas, pero son anchas. Sus electrodos son tan largos como ancha es la cámara. Poseen una plataforma de electrodos que puede estar fija en la cámara o puede ser desmontable. Las cámaras tipo I pueden poseer los cátodos en su parte superior (Configuración TAFE convencional), o en la parte inferior de las mismas (configuración TAFE invertida). En este último caso, los bloques de muestras se cargan en la parte inferior de los minigeles, por lo que en cada uno de ellos las moléculas migrarán en el sentido opuesto al de la fuerza de la gravedad.

Las ZNU pueden eliminarse de al cámara construyendo los muros frontales con la disposición adecuada (los muros frontales son paralelos a los electrodos), en particular, si los electrodos se disponen en configuración TAFE invertida. Para hacerlo, dichas paredes deben formar un anglo pequeño con el plano que contiene el cátodo y el ánodo que se ubican en el mismo lado del minigel, por lo que al igual que dicho plano, esas paredes formarán un anglo con el fondo de la cámara de electroforesis. En las cámaras con configuración TAFE convencional las regiones ZNU se eliminan colocando en la cámara piezas de la forma apropiada y construidas de un material de elevada constante dieléctrica.

Esas cámaras poseen varias regiones ZUE y soportan varios minigeles que se colocan a todo su ancho, uno a continuación del otro. Para lograrlo, pueden diseñarse marcos del ancho de la cámara. Ese marco se subdivide en marcos más estrechos donde se moldean simultáneamente todos los minigeles. El marco grande se coloca posteriormente en la cámara y sirve de soporte a todos los minigeles que se emplearán, permitiendo la manipulación de los mismos. Los minigeles también pueden ser moldeados simultáneamente en esos marcos, después extraídos de los mismos y cargados directamente en la cámara. Para ello, la cámara debe poseer en su centro piezas ranuradas lateralmente por donde puedan deslizarse dichos minigeles. La separación entre estas piezas será igual al ancho del minigel que pueda soportar, es decir al ancho de una ZUE. Para moldear los minigeles el marco debe colocarse entre planchas planas de acrílicos que contemplen donde colocar el peine. Todas esas piezas son fijadas entre sí. El marco puede tener ranuras laterales para fijar el peine en una sola posición.

A su vez, cada minigel admite una cantidad máxima de muestras, lo que depende de su ancho. De esta forma se dispondrá de cámaras con varias regiones ZUE, que admiten un minigel cada una y pueden separar pocas o muchas muestras simultáneamente con una fuente de potencia y electrodos comunes. El volumen de solución tampón empleada dependerá de la cantidad de ZUE empleadas. Así todas las muestras de todos los ZUE son además separadas en una solución tampón común, la temperatura del experimento es la misma para todas ellas y el voltaje aplicado es el mismo.

De acuerdo con todos los principios anteriores se logra que sean variables la cantidad de minigeles que se colocan en la cámara y el volumen de reactivos ("Bnt") empleados por cada experimento. También se logra variabilidad en la cantidad máxima de muestras ("Nt") que pueden analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.

Las cámaras tipo II. Una variante de cámara que se propone en esta invención y que evita el empleo de electrodos muy largos se describe a continuación. Al igual que las cámaras tipo I, las cámaras tipo II poseen una distancia pequeña entre sus electrodos opuestos, por lo que tienen poca profundidad y altura. Sin embargo, cada región ZUE está contenida en una miniplataforma de electrodos y estas pueden ser extraídas de la cámara y se colocan una detrás de otra. Cada una de ellas emplea un minigel en el que se cargan tantas muestras como admite su anchura, la que a su vez depende de la longitud de los electrodos de las miniplataformas.

Los electrodos de una o varias miniplataformas pueden ser energizados o no empleando una sola fuente de potencia. Para lograrlo, los electrodos de las miniplataformas se conectan en paralelo, es decir los ánodos consecutivamente y los cátodos consecutivamente. A diferencia de las cámaras tipo I, las regiones ZUE (o miniplataformas de electrodos) que no serán activadas en un experimento cualquiera pueden ser totalmente ocluidas con piezas que poseen una forma similar a la de la miniplataforma. Esas piezas se fabrican de un material de elevada constante dieléctrica. La conexión en paralelo entre las miniplataformas de la cámara garantiza la continuidad ente los electrodos de todas las miniplataformas de electrodos y permite que se realice la coelectroforesis a todas las muestras de todos los minigeles con una fuente de potencia y electrodos comunes. Así, todos los bloques de muestras son además separadas en una solución tampón común, la temperatura del experimento es la misma para todas ellas y el voltaje aplicado es el mismo para todas. De acuerdo con los principios anteriores se logra que sea variable la cantidad de ZUE que puede ser activada en la cámara, el número de minigeles que se empleará en un experimento, y el volumen de reactivos ("Bnt") por experimento. También se logra variabilidad en la cantidad máxima de muestras ("Nt") que puede analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.

En las cámaras tipo II, las múltiples miniplataformas de electrodos podrían poseer sus cátodos en su parte superior (configuración TAFE convencional) o en su parte inferior (configuración TAFE invertida).

En las cámaras tipo II, donde los electrodos se disponen en configuración TAFE invertida las regiones de la solución tampón por donde pasan las líneas de fuerza que no atraviesan el minigel pueden ser eliminadas con las propias paredes de la cámara. Para lograrlo, las paredes frontales de la cámara por donde se deslizan los electrodos deben formar un anglo pequeño con el plano que contiene el cátodo y el ánodo que se ubican en el mismo lado del minigel (o formar un ángulo pequeño con dicho plano), por lo que al igual que dicho plano, esas paredes formarán un anglo con el fondo de la cámara de electroforesis.

En la construcción de las cámaras tipo II, puede emplearse cualquier procedimiento o conexión para activar e inactivar las miniplataformas. Por ejemplo, colocar en la tapa los cables de conexión entre miniplataformas vecinas, o solo colocar en la tapa los conectores y que los cables sean exteriores, o colocar esas conexiones en las paredes de la cámara, o directamente entre las miniplataformas. Por otro lado, las miniplataformas pueden ser de cualquier forma que se ajuste bien a la cámara, siempre y cuando contengan su ordenamiento de electrodos en configuración TAFE, mientras que los electrodos de las miniplataformas pueden ser puestos permanentemente en la cámara, o en miniplataformas que pueden ser desmontadas de dicha cámara. Las regiones de la cámara donde no se van a activar miniplataformas, pueden ser eliminadas del experimento por cualquier procedimiento, ya sea colocando en ellas un bloque macizo, o bloques huecos que se fijan de cualquier manera a las paredes o se llenan de cualquier líquido. De manera similar a como se hace con las cámaras tipo I, los minigeles pueden ser moldeados en marcos, que pueden o no colocarse en la electroforesis.

B.- *La obtención de patrones de bandas reproducibles en las cámaras provistas en esta invención*

Como ya se mencionó, las cámaras provistas en esta invención se distinguen por:

- Poseer un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución tampón y además homogeneiza la temperatura y composición del tampón en la cámara de electroforesis.

- Disponer de un sistema para introducir o retirar los electrodos en la cámara de electroforesis, el que además garantiza que se mantenga el grado de tensión de los electrodos. Ese sistema emplea tapones elásticos que se colocan en orificios perforados en el piso o en las paredes laterales de las cámaras. Por la luz de dichos tapones se pasan los electrodos.

- Disponer de un sistema para que el experimentador pueda tensar los electrodos de la cámara MiniTAFE y multiminiTAFE.

En esta invención también se proveen un grupo de accesorios que son importantes para lograr patrones de bandas reproducibles. Ellos son:

- Un conjunto de accesorios que permite moldear minigeles que tienen superficie plana. Ese sistema garantiza la homogeneidad de todas las dimensiones de los minigeles.

- Un conjunto de accesorios que permite alinear en el origen de migración del minigel a los bloques de muestras.

- Un conjunto de accesorios para preparar bloques contienen los bloques de muestras de tamaños homogéneos.

B.1.- *Sistemas limitadores de turbulencias y homogeneizadores de la conductividad y temperatura del tampón en la cámara*

Es bien conocido que en las cercanías de los electrodos el tampón cambia sus propiedades conductivas debido a la electrólisis que ocurre en los electrodos. Esto es particularmente importante en el CHEF, que posee un ordenamiento hexagonal de múltiples electrodos que rodean al minigel. Por eso, en esas regiones de la cámara la conductividad "σ" del tampón puede ser diferente del valor de conductividad en otras regiones de la cámara. Esto es crítico en las mini-cámaras CHEF. La circulación del tampón electroforético a alta velocidad de flujo es equivalente a agitar dicha solución, pues es la manera de garantizar homogeneidad de la conductividad de todo el tampón de la cámara de electroforesis. Por ejemplo, un recambio del volumen total de la cámara en 3 minutos es suficiente para este fin.

Cuando ese electrolito circula a alta velocidad de flujo se generan turbulencias del fluido en la cámara. Otro posible origen de las turbulencias es que algunas bombas peristálticas que se emplean, inyectan el tampón en porciones como si fueran pulsos de líquido.

El sistema de circulación del tampón a alta velocidad de flujo desarrollado en esta invención se basa en el siguiente principio: Es necesario garantizar que el área de sección transversal al paso de la corriente en el tampón donde se sumerge el minigel, sea constante en toda la cámara de electroforesis.

La constancia del área de sección transversal impide que la corriente que circula en la cámara se modifique aleatoriamente por los cambios locales de resistencia del tampón provocados por la presencia de olas, remolinos o turbulencias durante la circulación. El principio se fundamenta en que la resistencia (R) del tampón de un electrolito cualquiera que se deposita en la cámara de electroforesis está dada por:

- la conductividad del electrolito (σ),

- la separación entre los electrodos de polaridades opuestas (d),

- el área de sección transversal al paso de la corriente (A).

Estas variables se relacionan según la fórmula XV.

$$R = (1/\sigma) \cdot (d/A) \qquad (XV)$$

Por eso, cuando "A" es diferente en zonas de la cámara, "R" también lo es y la corriente eléctrica "I" también.

El sistema limitador de turbulencias en las cámaras CHEF está formado por:

- dos tipos de láminas rectangulares, las de tipo A y las de tipo B, las que son de cualquier material de elevada constante dieléctrica,

- láminas que son del ancho del interior de la cámara, siendo las de tipo A de al menos 2 cm de altura y las de tipo B de 0, 5 cm de altura,

- láminas de tipo A que están despegadas de la base de la cámara una distancia entre 0,02 y 0,05 cm y siempre sobresalen de la solución tampón que se carga en la cámara, de tal forma que al circular el tampón por el interior de la cámara, este fluye solamente entre las láminas de tipo A y la base de la cámara,

- láminas de tipo B que están pegadas a la base de la cámara y sumergidas totalmente en la solución tampón, de tal forma que al circular el tampón en la cámara, este fluye solamente por encima de las láminas de tipo B, donde ambos tipos de láminas se ubican en la entrada y en la salida de la solución tampón de la cámara, desde la pared de entrada o salida de las mangueras hacia el interior de la cámara de electroforesis y en el siguiente orden, lámina de tipo A después lámina de tipo B, repitiendo "n" veces ese par de láminas, donde "n" es un valor entero entre 1 y 4 y quedando la última lámina aproximadamente a 1 cm de los electrodos, última lámina que debe ser de tipo A.

Así, el líquido bombeado desde el intercambiador de calor choca con la lámina de tipo A al caer en el interior de la cámara y pasa por debajo de ella. Después vuelve a chocar con la de tipo B y pasa sobre esa otra lámina. Hechos estos que se repiten con cada par de láminas del sistema limitador de turbulencias, hasta que dicho tampón pasa al compartimento donde se encuentran los electrodos y el minigel y lo atraviesa. Después el tampón sufre el mismo procedimiento en la región de la cámara desde la cual sale el tampón hacia el intercambiador de calor. Así se logra amortiguar cualquier oscilación que pueda existir en la superficie del líquido.

El sistema de limitación de turbulencias de la solución tampón en las cámaras TAFE esta formado por:

- dos láminas iguales y del mismo tamaño de las paredes de la cámara que son paralelas a los electrodos,

- láminas estas que son de un material de elevada constante dieléctrica y poseen una ranura horizontal en su tercio inferior,

- ranura que es del largo de los electrodos y de 0,3 cm de altura.

En este sistema las láminas están ubicadas, cerca de la entrada de la solución tampón y cerca de la salida de dicha solución. De esa forma, dividen la cámara en tres compartimentos:

el central que contiene los electrodos y el minigel, y los otros dos, por los que entran o salen las mangueras de la circulación. Durante la circulación, el tampón cae directamente en uno de esos compartimentos y de ahí fluye hacia el compartimento de electroforesis pasando por la ranura horizontal. Del compartimento de electroforesis sale pasando por la ranura horizontal de la otra lámina y cae en el compartimento donde se encuentra la manguera de salida. De este último sale hacia el intercambiador de calor. Así se amortigua cualquier oscilación que pueda existir en la superficie del líquido.

B.2.- *Conjunto de accesorios para garantizar homogeneidad de la corriente en el minigel*

Si se sigue el razonamiento anterior se comprende que si el gel, o matriz sobre la cual se realiza la electroforesis posee irregularidades, brindará un área (A) de sección transversal a la corriente que difiere entre sus diferentes regiones. Por tanto, "Rm" (resistencia al paso de la corriente en el gel) tiene que mantenerse constante en todas las regiones del gel.

El conjunto de accesorios para moldear minigeles de caras planas es en un dispositivo desarmable que consta de:

- una base plana.

- dos marcos, uno de ellos con una cavidad de forma rectangular y el otro con una cavidad cuadrada de 0,35 a 0,5 cm de espesor, los que poseen dos muescas donde se coloca un peine de dientes largos para formar el minigel con sus pocillos, donde el espesor de los marcos y las dimensiones internas de las cavidades determinan las dimensiones del minigel que se va a moldear para ser colocado como matriz de soporte en la electroforesis en las cámaras CHEF o TAFE.

- dos tapas, la tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, y la tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine.

- un segundo peine similar al anterior pero que posee dientes más cortos y permite empujar las muestras que se cargaron en los pocillos del minigel.

Los peines de dientes largos que imprimen los pocillos en el minigel, son en su parte anterior totalmente lisos y continuos con los dientes, mientras que en su parte posterior y por encima de los dientes están engrosados, formándose un escalón. Los peines provistos poseen dientes iguales de espesor comprendido entre 0,03 y 0,1 cm, ancho entre 0,15 cm y el ancho del minigel menos 0,3 cm y longitud de los dientes igual al espesor del minigel menos 0,15 cm. Así, al ensamblarse el peine, el marco y la base plana, los dientes quedan separados 0,1 cm de la base y el escalón posterior queda 0,1 cm más alto que el espesor del marco. Los peines de dientes cortos son iguales a los peines de dientes largos, pero sus dientes son 0,2 cm más cortos.

La tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine, posee dos caras planas. En uno de sus bordes tiene un reborde saliente que encajará en el marco al ser ensamblado el sistema. La tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, tiene una cara plana y la otra también plana, pero está rebajada en forma de cuña en uno de sus extremos.

El conjunto se emplea de la siguiente forma:

- sobre la base plana se coloca uno de los dos marcos, específicamente el que posee el tamaño del minigel que se desea preparar.

- se encajan las patas de uno de los peines de dientes largos en las muescas que posee el marco en su perímetro exterior, con lo cual quedarán los dientes separados 0,1 cm de la superficie de la base plana.

- la tapa 1, que encaja en la parte delantera del peine, se coloca sobre el marco y por delante del peine, con la cara plana volteada hacia el marco, la cara rebajada hacia arriba y la rebaja en forma de cuña pegada al peine.

- dicho conjunto de accesorios se inmoviliza apretando las tapas contra el marco por cualquier medio hasta que la cavidad que se forma entre ellos quede sellada y se vierte el minigel fundido a una temperatura apropiada, que cuando es agarosa está entre 65 y 70ºC,

- la tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine, se coloca sobre el marco, por detrás del peine, introduciendo el reborde en el escalón del peine de dientes largos, y se deja el sistema en reposo hasta que dicho minigel solidifique.

- se retira el peine de dientes largos y en la ranura en forma de cuña de la tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, se cargan los bloques de minigel que contienen las moléculas de ADN inmovilizadas, los que se hacen resbalar hacia los pocillos empujándolos con un aplicador cualquiera.

- una vez cargados los bloques de muestra en los pocillos del minigel, dichos bloques se empujan hacia el fondo de los pocillos con la ayuda del peine de dientes más cortos, lo cual se hace encajando sus patas en las muescas que posee el marco, lo que garantiza que ellos se introduzcan hasta el fondo de los pocillos.

Así se garantiza que se moldee un minigel plano, sin meniscos, en el cual todos los bloques de muestra fueron cargados a la misma altura y a la misma distancia del borde posterior o anterior del minigel. Todo lo anterior se logra sin que ocurra aplastamiento o ruptura de dichos bloques.

El conjunto de accesorios para moldear minigeles planos y el limitador de turbulencias impiden que el área de sección transversal del minigel varíe incontroladamente, por la formación de meniscos en las paredes del recipiente empleado para formar el minigel o entre los pocillos del minigel.

B.3.- *Conjunto de accesorios para formar bloques de muestra de tamaños homogéneos*

No obstante, aunque se garantice que el valor de "R" sea constante en todo el tampón de la cámara y en el minigel, si los bloques de agarosa que contienen las moléculas de ADN inmovilizada no son todos de dimensiones similares y se colocan en línea recta en el minigel, sin romperlos y a la misma distancia de los bordes anteriores y posteriores de los minigeles, entonces los patrones de bandas resultan distorsionados.

Los accesorios para preparar bloques de muestra de ADN incluidas en bloques de gel de dimensiones homogéneas y similares a la de los pocillos del gel donde serán cargados constan de:

- formadores de bloques de muestra que consisten cada uno de ellos en una lámina plana de cualquier material impermeable con espesor mayor que 0,5 cm, lámina que posee múltiples ranuras paralelas a todo su largo,

donde el ancho de cada ranura es de 0,2 cm, su profundidad es del espesor de los dientes de un peine dado, la que puede ser entre 0,03 y 0,1 cm, existiendo formadores para todos los posibles espesores de los dientes de todos los peines que pueden emplearse para imprimir los pocillos en el gel,

- una lámina plana y rígida de material impermeable de al menos 0,1 cm de espesor que actúa como tapa de los formadores de bloques,

- cortadores de bloques de muestras, donde cada uno es una barra que posee patas en sus extremos, lo que le confiere la forma de una "U" invertida, cuadrada y tan o más larga que las ranuras del formador de bloques, teniendo en la parte inferior de la barra varias protuberancias en forma de cuchillas, transversales a la longitud mayor de la barra y con el filo hacia abajo, donde el largo del extremo afilado de cada cuchilla es 0,2 cm y cada cuchilla sobresale por debajo de la barra más de 0,1 cm, estando las cuchillas de cada formador separadas una distancia específica que puede ser entre 0,15 cm y el ancho del gel menos 0,3 cm,

- poseen un procedimiento de empleo.

El uso de estos accesorios incluye los siguiente pasos:

- se prepara una suspensión de células en agarosa que se mantiene a 45ºC y se ambienta el formador de bloques de muestra y su tapa a 45ºC,

- se vierte dicha suspensión en las ranuras del formador de bloques de muestra,

- se cubre el formador de bloques de muestras con su tapa y se coloca a temperatura ambiente o en frío, hasta que solidifique el gel,

- una vez solidificado el gel se coloca el cortador de bloques de muestra a lo largo de la primera ranura, con sus cuchillas hacia abajo y los filos transversales a la dimensión mayor de la ranura,

- se presiona hacia abajo el cortador de bloques,

- se retira el cortador, se inclina el formador de muestras y se empujan los bloques hacia el interior de un recipiente que contiene la solución apropiada para el tratamiento de los bloques,

- se repite el procedimiento con las tiras de agarosa que solidificaron en todas las ranuras del formador.

Mediante este procedimiento, se garantiza que los bloques de muestra formados sean todos iguales y sus dimensiones coincidan con las dimensiones de los pocillos del gel donde serán cargados para someter después a las moléculas de ADN al procedimiento de electroforesis.

B.4.- *Sistema de fijación y tensión de electrodos para evitar distorsiones de las líneas isopotenciales en las cámaras de electroforesis*

En la invención se consideró que para que el gradiente de potencial aplicado a las moléculas durante la electroforesis no varíe aleatoriamente, es necesario que las líneas isopotenciales en el gel no estén distorsionadas. Eso se logra si los electrodos mantienen su estado de tensión. Para lograrlo, en esta invención se introdujeron los electrodos en la cámara a través de agujeros perforados en la base de las cámaras CHEF o en las paredes de las cámaras TAFE. En los agujeros se colocan entonces tapones elásticos de silicona, por cuya luz pasan los electrodos que provienen del exterior. Así se garantiza que, aunque el electrodo adelgace por su uso en la electroforesis de campos pulsantes, siempre estará aprisionado por el tapón y por tanto fijado.

Además, en el sistema TAFE los electrodos son largos. Por eso, en ocasiones, ellos se arquean. Para evitar ese problema, en esta invención se dotó a las cámaras TAFE de un sistema para tensar los electrodos. El sistema consta de:

- un vástago ranurado en su parte superior, vástago que gira y posee una muesca en forma de cintura, la que está atravesada por un orificio,

- orificio este, por donde se inserta el extremo de un electrodo y se dobla para que rodee la cintura del vástago,

- un prisionero que inmoviliza definitivamente al vástago en la posición deseada.

Este sistema se coloca en la salida del electrodo de la cámara. Los electrodos los tensa el experimentador mediante el siguiente procedimiento:

- se afloja el prisionero que inmoviliza al vástago en el cual está insertado el electrodo,
- se hace girar el vástago el ángulo requerido para que queden tensos dichos electrodos,
- se aprieta el prisionero para inmovilizar al vástago en su posición actual y mantener tenso el electrodo.

De esta forma se garantiza la existencia de líneas isopotenciales sin distorsión a todo lo ancho del gel vertical.

En la presente invención se garantizan los patrones reproducibles ya que se emplea un sistema adecuado para energizar los electrodos con los valores apropiados de voltaje y estos se mantienen tensos, además se emplean sistemas para garantizar que las migraciones de las moléculas de ADN de cualquier tamaño no sean perturbadas por cambios locales transitorios en la resistencia del tampón o del gel. Esos cambios provocan distorsiones en las carrileras de migración y en las bandas que forman las moléculas después del procedimiento de electroforesis.

C.- *Procedimientos de empleo de las cámaras de esta invención y procedimiento de cálculo para seleccionar el tiempo de electroforesis en las cámaras*

En esta parte de la invención, se creó un procedimiento de cálculo en el cual se estima el tiempo de electroforesis para condiciones diferentes de campo eléctrico, temperatura y duración de pulsos eléctricos. Se basa en que existe un conjunto de ecuaciones que describen la migración por pulso "m" de una molécula lineal de ADN en los equipos CHEF (López-Cánovas L y cols, J. of Chromatogr. A 1998,806,123-139) las que se incorporan totalmente por referencia.

$$m = vr \cdot tp \cdot \Gamma(tp - tr) + vm \cdot (tp - tr) \cdot [1 - \Gamma(tp - tr)]$$

donde

$$vr = 0{,}0207 \cdot [Q \cdot E^{1{,}45}/(8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot L^{1{,}35})];$$

$$vm = 0{,}665 \cdot [Q \cdot E^{1{,}76}/(8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot L^{1{,}08})];$$

$$tr = 0{,}134 \cdot (L^{1{,}14}/vr)^{0{,}926};$$

$$\Gamma(tp - tr) = 1 \text{ si} (tp - tr) \leq 0 \text{ y } \Gamma(tp - tr) = 0 \text{ si } (tp - tr) > 0.$$

En estas relaciones las variables y parámetros tienen las siguientes definiciones:

"tr" es el tiempo de reorientación (s) de una molécula de ADN lineal,

"vr" y "vm" son las velocidades de migración (en cm/s) de dicha molécula durante y después de la reorientación, respectivamente,

"Q" es la carga neta de la molécula (en statculombios) dada por $1e^{-} \cdot bp$, done "e^{-}" es la carga del electrón y "bp" los pares de bases,

"L" el largo del contorno (en cm) de la molécula lineal de ADN, dado por 0,34 nm · bp,

"E" es la intensidad del campo eléctrico en statvoltios/cm,

"η" es la viscosidad del tampón en Poises, calculada interpolando el valor de la temperatura experimental en un polinomio que relaciona la viscosidad del agua con la temperatura (en ºC) experimental,

"tp" es la duración del pulso (s).

Para alimentar el procedimiento se calcula primero la migración por pulso “m” de la molécula más pequeña. Esto se realiza:

- suministrando a las relaciones anteriores los valores de campo eléctrico, temperatura y tiempo de pulso que se emplearán en la electroforesis,

- suministrando a las relaciones anteriores el tamaño, en pares de bases “bp”, de la molécula de ADN más pequeña que se desea separar,

- calculando “m” siempre y cuando el campo eléctrico y la temperatura estén comprendidos entre 5, 8 y 16 V/cm y entre 10 y 30ºC, respectivamente, y asumiendo que en el procedimiento de electroforesis se emplea agarosa al 1,5% y como tampón de electroforesis TBE 0,5X (TBE 1X: Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3).

Una vez que se dispone de la migración por pulso, este valor se emplea para alimentar al procedimiento de cálculo del tiempo de electroforesis. En dicho procedimiento el tiempo de electroforesis (“te”, en segundos) se calcula como:

$$te = [(D/m) \cdot 2 \cdot tp]$$

El procedimiento requiere además como dato la distancia “D” en centímetros que se desea que la molécula más pequeña migre en el gel. El valor preferente de “D” es la distancia entre el origen de migración y el borde inferior del gel menos 0,1 ó 0,2 cm. Según el procedimiento los tiempos de electroforesis a 30ºC para separar moléculas de ADN de hasta 2 Mb están comprendidos entre 1,5 y 9 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente, mientras que para 10ºC ellos están entre 2,5 y 14,5 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente.

Todos los pasos anteriores garantizan el correcto empleo de la cámara y que cuando se aplica la misma intensidad de campo eléctrico, temperatura, tiempo de electroforesis, concentración de tampón, de gel y duración de los pulsos eléctricos se obtienen los mismos patrones de bandas. El procedimiento para llevar a cabo el procedimiento de electroforesis en las cámaras de invención, con la ayuda de los procedimientos y accesorios mencionados se resume en los siguientes pasos:

- la cámara está conectada a los dispositivos de alternar los campos eléctricos y se energizan los electrodos, se llena la cámara con solución tampón, se conecta la cámara al intercambiador externo de calor, se verifica que el sistema limitador de turbulencias está correctamente ubicado y se hace circular la solución tampón a través de la cámara hasta que. se alcance la temperatura deseada,

- con la ayuda de los accesorios para preparar geles planos y empleando el peine apropiado se preparan geles para la separación de las grandes moléculas de ADN, geles que son de hasta 0,5 cm de espesor según la cámara seleccionada,

- se cargan en los pocillos del gel los bloques de gel que contienen las moléculas de ADN que serán separadas, las que estaban previamente incluidas en dichos bloques, siendo las dimensiones de los bloques similares a la de los pocillos del gel,

- se detiene temporalmente la circulación y el gel cargado con los bloques se sumerge en la solución tampón que ya se encuentra a la temperatura deseada, se restaura la circulación,

- se calcula el tiempo de electroforesis que separará a las moléculas de ADN empleando un procedimiento de cálculo que depende de las condiciones experimentales que serán empleadas y del largo del gel en el que se realizará la electroforesis,

- se energiza el sistema y se realiza la electroforesis de las moléculas de ADN sobre el gel de caras planas, llevando a cabo la circulación de la solución tampón a alta velocidad de flujo.

A modo de resumen, las cámaras de esta invención son pequeñas, poseen distancias entre sus electrodos de polaridades opuestas que determinan todas sus dimensiones. A pesar de que son cámaras electroforéticas pequeñas, sus geles son lo suficientemente largos para evidenciar la separación de las grandes moléculas de ADN en patrones de bandas. Por tanto, las cámaras admiten gran cantidad de muestras, lo cual las convierte en una nueva herramienta para estudios que requieran resultados rápidos y la comparación de los resultados que brindan numerosas muestras. Este procedimiento puede realizarse en poco tiempo, con poco gasto de reactivos y de material biológico.

En las siguientes secciones se muestran varios ejemplos de realización de las cámaras y accesorios provistos en esta invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Cámaras con zonas útiles de electroforesis múltiples: multiminicámara TAFE tipo I

En la figura 1 se muestra una vista isométrica en explosión de la cámara (1). En la vista se muestran los cuatro electrodos (2) en configuración TAFE convencional. La anchura (3) de la cámara es de 316 mm, la altura (5) es 74 mm y la profundidad (6) es de 114 mm. También se señalizan las paredes frontales (8) y laterales (9) de la cámara. El fondo (18) de la cámara posee la excavación (7) sobre la cual descansa el marco (16) donde se moldean los minigeles (20) que emplea esta cámara. En las paredes laterales (9) se ubican las ranuras (4) por las cuales se desliza el marco (16). Las dimensiones del marco son: 48 mm de altura, 320 mm de ancho y 5 mm de grosor. Este marco soporta cuatro minigeles (20) de 38 mm de altura y 71,25 mm de ancho. Se muestra la ubicación de los pocillos (21) para cargar las muestras en los minigeles (20). Esos pocillos se forman al colocar un peine cuyos dientes son de 3 mm de ancho y se separan entre sí 2 mm.

La figura 1 muestra un esquema tridimensional de la tapa (22), de los bloques (17) que se colocan para eliminar de la cámara las regiones no útiles para electroforesis (ZNU), y de los bloques (15) que se colocan para eliminar de la cámara las regiones ZUE.

La figura 2 muestra los detalles de la vista lateral de la cámara (1). Señalizado con cruces (+) se muestra la ubicación de los extremos de los electrodos (2) en dicha pared, con los cátodos colocados en su parte superior y los ánodos en la inferior. Los electrodos son de 316 mm de longitud y se colocan paralelos con la pared frontal (8 en la figura 1) de la cámara. En el centro de la pared lateral (9 en la figura 1) y equidistante de los ánodos o cátodos se ubica la ranura (4) por donde se desliza el marco (16) que contiene los minigeles, o solo los minigeles de 5 mm de espesor. Sombreados con líneas inclinadas se muestra la ubicación de los bloques (17) que eliminan de la cámara las regiones ZNU, la tapa (22) de la cámara y el fondo (18). Las caras externas de los bloques (17) son paralelas a las paredes frontales (8) de la cámara, mientras que sus caras internas pueden formar un pequeño anglo con el plano que contiene al cátodo y al ánodo de un mismo lado del gel. Existen tantos bloques (17) como regiones ZUE haya en la cámara. Los bloques (15) se emplean para ocluir regiones ZUE.

La cámara (1) (figura 1) posee cuatro regiones ZUE. En las regiones ZUE activas se colocan los bloques (17) (figura 2) que eliminan las regiones ZNU. Para ocluir las regiones ZUE que se inactiven, se sustituyen los bloques (17) (figura 2) por los bloques (15) (figura 2) de sección rectangular.

En las regiones ZUE inactivas no se coloca minigel.

Para moldear los minigeles (20) (figura 1) se coloca el marco (16) (figura 1) sobre una placa de acrílico, teflón u otro material apropiado y se ubica el peine, o peines aislados. Con posterioridad, se vierte la agarosa, como se hace convencionalmente y se cubre con placas apropiadas.

Para efectuar la electroforesis se cargan los bloques de muestra en los pocillos (21) de los minigeles (20, figura 1), estos se cargan en la cámara (1, figura 1), deslizando el marco (16, figura 1) por las ranuras (4, figura 1). Las ZUE que no serán empleadas se ocluyen con los bloques (15, figura 2) y en las ZUE que se emplearán se colocan los bloques (17, figuras 1 y 2). La cámara (1, figura 1) se llena con la solución tampón y los electrodos (2, figura 1) se energizan a través de la unidad de conmutación de los campos eléctricos mediante una fuente de potencia. Para mantener la temperatura constante se hace circular solución tampón fría. Las mangueras de entrada y salida para el enfriamiento de la solución tampón se colocan en las paredes frontales (8 en la figura 1) de la cámara 1.

La figura 3 muestra los 52 patrones de bandas (24) que brindaron los cromosomas de *S. cerevisiae* en los cuatro minigeles (20 en la figura 1) de la cámara (1, figura 1). Esos patrones fueron obtenidos a 8,33 V/cm, 15ºC, en agarosa 1,5%, solución tampón TBE 0,5X, 12 horas de electroforesis y 80 segundos de duración de los pulsos eléctricos. Los minigeles fueron moldeados en el marco (16 en la figura 1) como se describió anteriormente.

Con experimentos realizados en la cámara (1, figura 1), empleando la solución tampón TBE 0,5X, 1,5% de Agarosa (Lachema), una, dos, tres o las cuatro regiones ZUE, y para altura constante de tampón, se obtuvo para la ecuación IV:

$$C(\text{vasija}) = a_0 + a_1\,(d/L)^{0,1}$$

donde a_0 = -0,786 y a_1 = 1,047 y poseen varianzas de 1, 451 $\cdot$ 10^{-4} y 1,6949 $\cdot$ 10^{-4} respectivamente. Ambos coeficientes difirieron significativamente de cero. Se obtuvo además para la ecuación VIII

$$Rp^{0,5} = -1,522 + Re \cdot 2,1096 \cdot 10^{-2} + 87,31/V_{DC} + \text{Temperatura} \cdot 2,2697 \cdot 10^{-2}$$

Los coeficientes de las ecuaciones se determinaron con mediciones de "V_{DC}" e "I_{DC}" en las cámaras. Lo que permitió estimar "I_0" y los valores máximos de E que pueden aplicarse en cámaras MultiMiniTAFE (Tabla 3). Los

resultados están calculados para las fuentes de potencia más empleadas en ECP. Este procedimiento se usó para seleccionar las dimensiones de las cámaras que fueron construidas. Como era de esperar, la polarización del electrolito "I_0" no depende linealmente del campo.

Para la constante de agotamiento del tampón se obtuvo:

$$k = -3{,}6365 \cdot 10^{-2} + \text{Campo} \cdot 1{,}6135 \cdot 10^{-2}$$

Por otro lado, de acuerdo con las ecuaciones ajustadas si se emplea una fuente de potencia cuya salida máxima de potencia es 200 vatios y 0,4A, se obtendrá que cuando se usan la cuatro cámaras, 20ºC, los valores de "E" cercanos a 10 V/cm requieren que la solución tampón se reemplace cada una hora, lo cual indica que cuando se emplean las cuatro regiones ZUE la cámara no es eficiente para esos valores de campo eléctrico. En el ejemplo de la figura 3, los patrones de bandas de ADN cromosomales de *S. cerevisiae* contenidas en las 52 muestras se obtuvieron en solo 12 horas, pero fue necesario cambiar 1 L de solución tampón después de 7 horas de electroforesis. Ese tiempo coincide con lo predicho por las ecuaciones.

TABLA 3

Intensidades máximas de campo eléctrico ("E") que pueden aplicarse en cámaras multiminiTAFE de diferentes anchos, empleando varias fuentes de potencia ECP

Fuente de potencia	Ancho Cm	E volt/cm T = 10ºC	E volt/cm T =15ºC	E volt/cm T = 20ºC	E volt/cm T = 25ºC	E volt/cm T = 30ºC
Imax = 0,4 Vmax = 500 Pmax = 200	10	25,8	22,6	19,9	17,4	15,4
	20	17,4	15,4	13,5	11,9	10,6
	30	13,0	11,5	10,3	9,1	8,1
	40	10,3	9,1	8,1	7,2	6,4
	50	8,2	7,3	6,5	5,8	5,3
Imax = 1,0 Vmax = 600 Pmax = 300	10	49,6	46,4	43,5	40,8	37,9
	20	40,6	37,9	33,5	29,5	26,0
	30	32,3	28,6	25,3	21,3	19,9
	40	25,3	22,4	19,9	17,7	15,7
	50	20,3	17,9	15,9	14,2	12,6
Imax = 1,0 Vmax = 300 Pmax = 300	10	38,3	38,3	38,3	38,3	38,2
	20	38,3	38,2	35,8	33,6	31,7
	30	35,3	33,1	31,2	29,2	27,6
	40	31,2	29,3	27,6	26,0	24,5
	50	27,8	26,2	24,6	23,3	21,9

Puede diseñarse una variante de la cámara anterior que no emplee los bloques (17, figura 1) que eliminan las regiones ZNU. Sus ventajas y deficiencias son similares a la de la anterior, pero emplean mayor cantidad de reactivos, la corriente eléctrica y por tanto, la potencia que se genera en ellas es mayor. No obstante la solución tampón demora más tiempo en agotarse. También pueden diseñarse variantes de estas cámaras con configuración TAFE invertida. El diseño de cámaras con electrodos ordenados en configuración TAFE invertida se muestra a continuación en el ejemplo de cámaras tipo II.

"E" se estimó con las ecuaciones II, III, IV y V. Imax: corriente máxima (en amperios) de salida de la fuente, Vmax: voltaje máximo (en voltios) de salida de la fuente, Pmax: potencia máxima (en vatios) de salida de la fuente. Los valores de "E" se estimaron para el 85% de Imax, Vmax y Pmax de las fuentes de potencia empleadas.

De acuerdo con los principios anteriores, se logra que sea variable la cantidad de ZUE que puede ser activada en este tipo de cámara, el número de minigeles que empleará en un experimento, y el volumen de reactivos ("Bnt")

por experimento. También se logra variabilidad en la cantidad máxima de bloques de muestras ("Nt") que pueden analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.

Ejemplo 2

Cámaras con zonas útiles de electroforesis múltiples: multiminicámara TAFE tipo II

Las figuras 4-7 muestran varias vistas de una cámara tipo II de 3 miniplataformas desmontables de electrodos.

La figura 4 muestra la vista lateral despiezada de un corte de la cámara (34), la miniplataforma desmontable de electrodos (25) y el marco (30) que sostiene al gel (31) y los bloques de muestras (36). En la miniplataforma (25) los cátodos (26) están en el fondo de la cámara, mientras que los ánodos (27) están en la parte superior (configuración TAFE invertida). Las paredes exteriores (28) juegan el mismo papel que los bloques (17) de las cámaras tipo I (figuras 1 y 2), es decir, eliminan las regiones ZNU. En la parte central de la miniplataforma está presente la ranura (29) por donde se desliza el marco (30) que contiene el minigel (31) de esa miniplataforma. Las piezas (40) de las miniplataformas (25) contienen los conductos (41) por donde pasan las mangueras para la circulación de la solución tampón en la cámara.

Se muestra además las paredes frontales (33) de la cámara (34) donde pueden colocarse opcionalmente las miniplataformas (25). En la cámara (34), las paredes de las miniplataformas (28) poseen una ranura (32) para comunicar toda la solución tampón que circula por la cámara. Durante el montaje o desmontaje de las miniplataformas, las piezas (40) se deslizan por ranuras (35) hechas en las paredes frontales (33) de la cámara (34).

La figura 5 muestra la vista superior de la cámara (34) con sus tres miniplataformas de electrodos (25) colocadas.

La figura 6 muestra una vista en planta superior de la cámara (34) y de algunos detalles descritos en las figuras anteriores. En la vista se esquematiza que en la cámara solo se colocó una miniplataforma de electrodos (25). Las dos regiones restantes, donde se podrían ubicar otras dos miniplataformas, se ocluyen con las piezas (42) que se construyen de un material de elevada constante dieléctrica.

La figura 7 muestra la vista en planta superior de la tapa (55), los conectores (43) y (45) y las conexiones eléctricas (44) y (46). Los cátodos (26 en la figura 4) de las tres miniplataformas se conectan en paralelo mediante los conectores (43) y las líneas eléctricas (44), mientras que los ánodos (27 en la figura 4) se conectan en paralelo mediante los conectores (45) y las líneas eléctricas (46). De esta forma los electrodos de todas las miniplataformas adquieren continuidad. En esta cámara cada miniplataforma tiene su marco (30) para sostener el gel (31) (figura 4). Los bloques de muestras (36 en la figura 4) se colocan en la parte inferior del gel, pues los electrodos están ordenados en configuración TAFE invertida.

Para llevar a cabo las electroforesis en esta cámara, primero se decide cuántas miniplataformas (25) (figura 4) se activarán y las restantes se ocluyen o inactivan con las piezas (42). Se moldean los minigeles (31) de manera similar a como se realiza en las cámaras tipo I y se cargan los bloques de muestras. Después se colocan en las miniplataformas los marcos conteniendo los minigeles y muestras. Estos pueden cargarse en la cámara antes o después de añadir la solución tampón. Una vez concluido el procedimiento, se conecta la tapa y los electrodos se energizan a través de la unidad de conmutación de los campos eléctricos, la que se conecta a la fuente de potencia.

Ejemplo 3

Cámaras con zonas útiles de electroforesis únicas: minicámara CHEF

En la figura 8 se muestra un esquema de una mini-cámara de tipo CHEF. Dentro de un arreglo hexagonal de dieciocho electrodos (60) se coloca un gel (61) de agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz. El gel (61) se fija en su posición con soportes en forma de escuadra (62) pegados a una placa base (63) que se introduce en una depresión (69) del piso de la cámara. Dentro del gel (61) se cargan los bloques de muestras (64) del mismo material del gel conteniendo moléculas de ADN inmovilizadas de talla cromosómica. Los bloques de muestras (64) conteniendo las moléculas de ADN se cargan en una posición tal que al ser sometidos a un campo eléctrico de determinada intensidad y que alterna su dirección de aplicación permite la separación de las moléculas de acuerdo con su talla en un patrón con bandas rectas y reproducibles entre las carrileras. La cámara se llena con una solución tampón para permitir la movilidad de las moléculas.

La temperatura, pH, concentración y otros parámetros de la solución deben mantenerse homogéneos en toda la cámara y constantes durante todo el procedimiento de separación electroforética de las moléculas. Por esta razón se mantiene un intercambio constante entre la solución de la cámara y un volumen extra que se coloca en un medio termostatado.

Para lograr la homogeneidad de la solución es importante que la circulación de la misma se efectúe a una velocidad de flujo elevada. La solución se añade a la cámara por la entrada (65) y se recoge por la salida (66). Después de la

entrada (65) y antes de la salida (66) se encuentra un sistema (67) para limitar la formación de turbulencias en la solución. En la figura se señalan dos láminas de tipo A (67) que se desensamblaron para que se pueda ver la lámina de tipo B en el fondo de la cámara. Las turbulencias en la solución afectan la homogeneidad del campo eléctrico en la cámara y provocan distorsión en los patrones de bandas.

En la tabla 4 se presentan algunas dimensiones físicas de mini-cámaras CHEF que no limitan el alcance de esta patente pero son ilustrativas de las cámaras que se desean proteger.

TABLA 4

Parámetros reales en algunas mini-cámaras de tipo CHEF

Cámara	MiniCHEF 1	MiniCHEF 2	MiniCHEF 3
Separación entre electrodos de polaridad opuesta (cm)	11,6	6,2	11,6
Número de electrodos	18	18	36
Área de la base de la cámara (cm^2) incluyendo el limitador de turbulencias	272	94	272
Volumen de solución tampón en la cámara (ml)	225	80	225
Dimensiones del gel cuadrado (cm)	4 x 4 x 0,5	2,2 x 2,2 x 0,2	4 x 4 x 0,5
Dimensiones del gel rectangular (cm)	7 x 4 x 0,5	3,6 x 2,2 x 0,2	7 x 4 x 0,5
Número de bloques de muestra de 0,15 cm de ancho cargados en el gel rectangular	27	13	27

Ejemplo 4

Cámaras con zonas útiles de electroforesis únicas: minicámara TAFE

En la figura 9 se muestra un esquema de una mini-cámara de tipo TAFE de configuración de electrodos de tipo TAFE invertido. El gel (71) que es también de agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz se coloca verticalmente en medio de los dos electrodos positivos (72) y los dos negativos (73). Los bloques de muestra (74) que contienen las moléculas de ADN se cargan en posición tal que al ser sometidos a un campo eléctrico de determinada intensidad y que alterna su dirección de aplicación permite la separación de las moléculas de acuerdo con su talla en un patrón de bandas recto. La cámara se llena con una solución tampón para permitir la movilidad de las moléculas. Para la recirculación de la solución, esta se añade a la cámara por la entrada (75) y se recoge por la salida (76). Después de la entrada (75) y antes de la salida (76) se encuentra un sistema (77) para limitar la formación de turbulencias en la solución. En la tabla 5 se presentan algunas dimensiones físicas de las mini- cámaras MiniTAFE que no limitan el alcance de esta patente pero ilustran las cámaras que se desean proteger.

TABLA 5

Parámetros reales en algunas mini-cámaras de tipo TAFE

Cámara	MiniTAFE 1	MiniTAFE 2
Separación entre electrodos de polaridad opuesta (cm)	7,8	10
Área de la pared donde se fijan los electrodos (cm^2)	127,7	166,8
Dimensiones de la cámara (cm)	15,2 x 7,1 x 8,4	20,1 x 6 x 8,3
Volumen de solución tampón (ml)	530	800
Dimensiones del gel (cm)	7 x 4 x 0,5	6,3 x 5,2 x 0,4
Cantidad de bloques de muestra de 0,15 cm de ancho	27	24

Ejemplo 5

Parámetros eléctricos de algunas mini-cámaras de esta invención

La distancia entre los electrodos de polaridad opuesta que tienen estas cámaras (menor o igual a 15,0 cm) permite aplicar campos eléctricos de hasta 25 V/cm en el TAFE y 16 V/cm en el CHEF, cuando se llenan con TBE 0,5X (TBE 1X: Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3), empleando fuentes de potencia cuya salida de potencia máxima no excede 300 vatios y a voltajes menores a 375,0 V. La resistencia eléctrica de estas cámaras es de varios miles de ohmios, esto es debido al poco volumen de solución que se emplea. Por esta razón se pueden alcanzar intensidades de campo eléctrico elevadas utilizando fuentes de poca potencia máxima.

En la tabla 6 se muestran los parámetros eléctricos y el consumo de energía eléctrica de algunas cámaras como las que se presentan en esta invención. En este caso las mediciones se hicieron con los volúmenes de solución TBE 0,5X descritos en las tablas 4 y 5 a una temperatura de 20ºC.

TABLA 6

Parámetros eléctricos de las mini-cámaras CHEF y TAFE

Cámara	miniCHEF 1		miniTAFE 1	
Potencia del campo eléctrico (V/cm)	10	16	8	20
Voltaje aplicado (V)	116,0	185,5	62,4	156,0
Intensidad de corriente eléctrica (mA)	85,0	139,9	63,4	168,0
Potencia generada (vatios)	9,8	26,0	4,0	26,2

Ejemplo 6

Forma de fijar los electrodos en las cámaras CHEF v TAFE

En la figura 10 se muestra la forma en que se fijan los electrodos de las mini-cámaras de tipo CHEF y en las mini y minimulticámaras TAFE en sus posiciones.

Los electrodos son un alambre (81) de platino de diámetro aproximado 0,05 cm. Ellos son los que trasmiten la energía eléctrica desde un circuito electrónico externo hacia la solución que se encuentra en el interior de las cámaras para establecer el campo eléctrico que provoca la migración y separación de las moléculas de ADN.

El fondo (82) de las cámaras de tipo CHEF y dos de los laterales (83) (los mismos que sostienen el gel) de las cámaras de tipo TAFE se perforan para permitir el paso del alambre de platino que formará el electrodo. Para mantener fijos los electrodos e impedir la fuga de solución por estos orificios se insertan los alambres (81) en la luz de un tapón elástico (84) u otro material muy flexible que se adapte perfectamente al orificio y al alambre (81) aunque este adelgace con el uso.

Ejemplo 7

Ejemplo de sistema para preparar geles con caras planas

Un elemento esencial para la obtención de patrones de bandas rectos y reproducibles en estas cámaras es la forma de los geles (61) y (71). Las caras de estos deben ser perfectamente planas o se alteraría la homogeneidad del campo eléctrico en su interior y se distorsionaría el patrón. En la figura 11 se muestra la vista posterior de los accesorios que se emplean para moldear los geles (61) y (71).

Los geles (61) y (71) se moldean sobre una base (91) de superficies planas y suficientemente grande como para contener un marco (92). El espesor del marco (92) determinará el grosor del gel que se moldeará. Las dimensiones del espacio interior (93), también de superficies planas, determinarán el ancho y el largo de los geles (61) y (71).

En el perímetro exterior del marco (92) se encuentran las ranuras (94). Las mismas se encuentran cerca y a la misma distancia de uno de los bordes del marco (92). Las patas 96 del peine (95) se insertarán en las ranuras (94), ya que las ranuras (94) son tan anchas como las patas (96).

El peine (95) tiene, además, dientes (97) cuyos grosores se afinan para que sus secciones transversales sean iguales a la de los bloques de muestra (64) y (74). Los dientes (97) quedan hacia una de las caras del peine (95) y su longitud es igual al grosor del marco (92) menos 1,0 mm, por detrás de los peines queda un escalón. Las patas (96) tienen esta misma longitud. En la figura 11 se muestra la ampliación de uno de los dientes (97) y donde se aprecia el escalón.

La tapa (100) es de caras planas y uno de sus bordes está rebajado en forma de cuña (101), por lo que una de las caras planas es mayor que la otra. Se muestra la ampliación de una sección del borde en forma de cuña (101). El ancho de la tapa (100), al menos por el borde rebajado en forma de cuña (101), es mayor que el ancho del espacio interior (93) del marco (92).

La tapa (103) tiene también caras planas excepto por un borde donde tiene el saliente (104) de 0,1 cm de espesor. Se muestra la ampliación de una sección del saliente (104). El ancho del saliente (104) es mayor que el del espacio interior (93) del marco (92) pero menor que la distancia entre las caras interiores de la patas (96). El peine (105) es similar al peine (95) pero sus dientes (106) son 0,2 cm más cortos.

Para moldear el gel se coloca la base (91) sobre una superficie horizontal, sobre ella se pone el marco (92) con las muescas hacia atrás. El peine (95) se inserta en las ranuras (94) de forma que los dientes (97) queden hacia delante. Luego se pone la tapa (100) sobre el marco (92) y por delante del peine (95) con la cara plana mayor hacia abajo y el borde con la rebaja (101) en forma de cuña pegado al peine. Las flechas indican la dirección en que se ensamblan los accesorios. El conjunto de accesorios se inmoviliza apretando el marco (92) contra la base (91) con ayuda de presillas u otro dispositivo. Por detrás del peine (95) se vierte la agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz. La temperatura de este líquido en el caso de las agarosa fundida es de 65 a 70ºC. Para otra solución puede variar la temperatura. El volumen de gel fundido a añadir debe ser suficiente para llenar la cavidad que queda entre la base (91), las paredes del espacio (93) del marco (92) y la tapa (100) y que se forme un menisco detrás del peine (95). Luego se coloca la tapa (103) con la cara plana hacia abajo y el borde saliente (104) pegado al peine (105) por detrás, esto elimina el volumen de gel fundido sobrante. Todo el conjunto de accesorios se deja reposar hasta que el material solidifique.

Cuando el gel (61) ó (71) se haya moldeado, se retira el peine (95) y se cargan los bloques de muestra (64) ó (74) en los pocillos (107) formados al retirar los dientes (97). Como la sección transversal de los dientes (97) es igual a la de los bloques de muestra (64) y (74) estos quedan uniformemente cargados a todo lo ancho y a la misma distancia del borde del gel (61) ó (71). Cuando se han cargado todos los bloques de muestra (64) y (74) que se deseen, se empujan hacia adentro del gel (61) ó (71) con ayuda del peine (105) y entonces quedan también a la misma profundidad.

El uso adecuado de los accesorios descritos en la presente invención permite moldear geles de caras perfectamente planas y los bloques de muestra con las moléculas de ADN inmovilizadas quedan perfectamente alineados. Esta es una de las condiciones necesarias para obtener patrones de bandas rectos y repetitivos.

Ejemplo 8

Tipos de geles de las mini-cámaras CHEF. Forma de colocarlos en las mini-cámaras

En las mini-cámaras de tipo CHEF se puede colocar geles de diferentes tamaños. Para retener el gel (61) (figura 12) en una posición fija durante la electroforesis se utiliza una placa base (63) rectangular de plástico o acrílico. Sobre la placa base (63) se colocan cuatro piezas (62) en forma de escuadra. Las escuadras (62) se colocan de forma que rodeen las cuatro esquinas de un rectángulo o cuadrado donde se colocará el gel (61). La distancia entre las caras interiores de las escuadras (62) es igual a las dimensiones (largo y ancho) del gel (61) que se colocará. La altura de las escuadras (62) no debe ser mayor de 0,2 cm para que no se conviertan en obstáculos que deformen el campo eléctrico generado en la cámara.

La placa base (63) se inserta en el fondo de la cámara en el centro de los electrodos (60). En esta zona de la cámara se encuentra una depresión (69) con forma rectangular y con las mismas dimensiones de la placa base (63). La profundidad de la depresión (69) es igual al espesor de la placa base (63) para que el gel (61) quede a nivel con el resto del piso de la cámara. La placa base (63) tiene algunas rebajas en los bordes y las esquinas para facilitar su extracción cuando termina el experimento. Todas las placas base (63) son idénticas excepto por la posición de las escuadras (62). De esta forma se pueden utilizar geles (61) de diferente tamaño en la misma cámara. Es importante que todo el sistema garantice que el gel (61) quede perfectamente centrado durante las electroforesis para obtener los patrones electroforéticos rectos y reproducibles.

Para realizar una electroforesis se carga el gel (61) con los bloques de muestra (64) que contienen las moléculas de ADN colocados (preparado con ayuda de los accesorios descritos en el ejemplo 7) y se coloca sobre la placa base (63) entre las cuatro escuadras (62). Luego se toma la placa base (63) con el gel (61) encima y se coloca en la depresión (69) del fondo de la cámara. Es importante que los bloques de muestra (64) queden hacia la zona donde se encuentran los cátodos puesto que las moléculas de ADN en solución y a pH neutro se cargan negativamente y migran hacia los ánodos. Cuando se termina la electroforesis el gel (61) se extrae para teñirlo y visualizar el patrón de bandas. Si se

desea utilizar un gel (61) de diferente tamaño o limpiar la cámara se extrae la placa base (63) introduciendo un palillo en las rebajas (111) de la placa base (63) y haciendo palanca.

Ejemplo 9

Sistema para tensar los electrodos de las mini-cámaras TAFE

Los electrodos de las mini-cámaras TAFE pueden distenderse con el uso. En la figura 13 se muestra un dispositivo para tensar los alambres de platino (81) que forman los electrodos. El vástago (115) tiene una rebaja en forma de cintura (116) en la que se perfora un orificio (117) de diámetro ligeramente superior al del alambre de platino (81). El alambre (81) se introduce por el orificio (117) y se hace girar el vástago (115) con ayuda de un destornillador a través de la ranura (118) hasta tensar el alambre (81). Para fijar la posición del vástago (115) se utiliza un prisionero (119) que se afloja antes de tensar el alambre (81) y se aprieta luego.

Ejemplo 10

Sistema limitador de turbulencias en las mini-cámaras CHEF

Las mini-cámaras de tipo CHEF poseen un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución, permitiendo así la circulación de la solución a velocidades de flujo altas.

En la figura 14 se muestra en detalle el sistema que limita la formación de turbulencias en la solución para las cámaras de tipo CHEF. El mismo está formado por láminas impermeables de tipo A (121) y de tipo B (122) de un material de elevada constante dieléctrica para no afectar el campo eléctrico aplicado.

Las láminas de tipo A (121) son más altas y se colocan despegadas del piso de la cámara de forma que la solución no pueda nunca desbordarse por encima de ellas sino que siempre pase por debajo. Las láminas de tipo B (122) son más bajas, se pegan al piso de la cámara y su altura es siempre mayor que la separación entre las láminas de tipo A (121) y el piso de la cámara.

Las láminas de tipo A (121) y de tipo B (122) se colocan alternadamente comenzando y terminado con una lámina de tipo A (121) y colocando entre ellas láminas del tipo B (122). Los conjuntos de láminas de tipo A (121) y de tipo B (122) se colocan después de la entrada (65) y antes de la salida (66) y se puede poner tantas láminas de tipo A (121) y de tipo B (122) como se desee hasta 1,0 cm de distancia de los electrodos.

La solución tampón se inyecta por la entrada (65) y pasa alternadamente por debajo de las láminas de tipo A (121) y por encima de las láminas de tipo B (122). Esta trayectoria sesgada (indicada por las flechas) va amortiguando los cambios de presión que se producen en la inyección de forma tal que al pasar por encima del gel (61) la velocidad de flujo de solución es casi constante y no posee turbulencias.

En el otro extremo de la cámara donde se recoge la solución por la salida (66) ocurre el mismo procedimiento.

Ejemplo 11

Sistema limitador de turbulencias de las cámaras TAFE

Las cámaras de tipo TAFE con ZUE únicas o múltiples también poseen un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución, permitiendo así la circulación de la solución a velocidades de flujo altas.

En la figura 15 se muestran detalles del sistema de limitación de turbulencia en la solución de las mini-cámaras de tipo TAFE con ZUE única.

El sistema está formado por láminas impermeables (131) de material de elevada constante dieléctrica que ocluye totalmente el paso de la solución que se inyecta por la entrada (75) y se recoge por la salida (76) excepto por las ranuras (132). Las variaciones de presión que se producen en la solución al ser inyectadas y entradas de la cámara son amortiguadas en las cavidades (133) y al pasar por la zona donde está el gel (71) la velocidad de flujo de la solución es casi constante y no provoca turbulencias. Las flechas indican la trayectoria que sigue el tampón desde que se inyecta por la entrada (75) hasta que se recoge por la salida (76).

La velocidad de flujo máxima que puede aplicarse a estas cámaras sin que se formen turbulencias en la solución de forma apreciable varía con el tamaño y volumen de las cámaras. En la tabla 7 se muestra la velocidad de flujo máxima que pudo ser alcanzado en algunas de las cámaras como las que se presentan en los ejemplos 3 y 4 sin que se formaran turbulencias apreciables en la solución.

TABLA 7

Flujo máximo de circulación de la solución tampón en las mini-cámaras de ECP sin que se formen turbulencias en la solución

Cámara	Volumen (ml)	Flujo máximo sin turbulencias (ml/minuto)	Tiempo de recambio del tampón (minutos)
MiniCHEF 1	225	100	2,25
MiniTAFE 1	530	280	1,89
MiniCHEF 2	80	44	1,82

El tiempo de intercambio del tampón se refiere al tiempo que tiene que transcurrir hasta que debe cambiarse un volumen de cámara del tampón.

Ejemplo 12

Conjunto de accesorio para preparar los bloques de muestras

Como ya se mencionó es imprescindible disponer de bloques de muestras idénticos en formas, dimensiones y concentración de ADN para obtener reproducibilidad en los patrones de bandas. Esos bloques de muestra a su vez deben poseer dimensiones y formas similares a la de los pozos formados en el gel de electroforesis.

En la figura 16 se muestra uno de los conjuntos de accesorios diseñados para obtener bloques de muestra con las características mencionadas en el párrafo anterior. El sistema está compuesto por el aplicador de bloques de muestra (141), el manipulador de bloques de muestra (142), el formador de bloques de muestra (143), su tapa (144) y el cortador de bloques de muestra (145).

En el ejemplo, el formador de bloques de muestra (143) es una lámina rectangular (7 x 6,9 x 1 cm longitud x ancho x espesor) de acrílico, goma o silicona con caras planas y pulidas; una de las caras de mayor área tiene once ranuras superficiales (146) que son rectangulares y paralelas. Ellas están espaciadas a todo lo ancho, de tal forma, que el ancho de la ranura coincide con el alto del bloque de muestra (148) y la profundidad de la ranura (146) coincide con el grosor de los bloques de muestras (148).

Sobre la cara ranurada del formador de bloques de muestra (143) se coloca la tapa (144), la cual es otra lámina rígida de acrílico o vidrio completamente plana. Ambas partes, (143) y (144) se mantienen unidas para garantizar la hermeticidad entre los canales de fundición que forman las ranuras (146). Con la ayuda de una pipeta se rellenan las ranuras con una suspensión de células en agarosa apoyando la punta de la pipeta en el extremo de cada uno de los canales de fundición. La mezcla se vierte con cuidado de llenarlos completamente y se deja en reposo el sistema hasta que la agarosa solidifique. La tapa (144) se retira, deslizándola transversalmente a las ranuras (146) para no arrastrar las tiras (147) de la agarosa solidificada. Las tiras (147) se cortan en pequeños bloques de muestra (148) con el cortador (145). Para ello se apoya el filo de los dientes (149) perpendicularmente y sin corrimientos contra la cara inferior de cada ranura (146). La distancia entre los dientes del cortador definen el ancho de los bloques de muestra (148), de esta forma se garantiza que todos los bloques de muestra (148) que contienen las muestras de ADN queden con la misma forma y dimensiones.

Una vez cortados los bloques de muestra (148), el aplicador de bloques de muestra (141) se usa para arrastrarlos por las ranuras (146) y así dejarlos caer en los recipientes que contienen las soluciones de tratamiento de las células. El aplicador de bloques de muestra (141) también sirve para cargar los bloques de muestra (148) en los pocillos (107) (figura 11) del gel de electroforesis. El manipulador de bloques de muestra (142) se utiliza para extraer los bloques de muestra del recipiente donde se tratan para la preparación de las moléculas de ADN o del frasco donde se almacenan para su conservación.

Ejemplo 13

Patrones de bandas de los cromosomas de Saccharomyces cerevisiae separados en una mini-cámara TAFE (con una ZUE única)

En la figura 17 se muestra un ejemplo de electroforesis en una mini-cámara TAFE de 7,8 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas. Esa mini-cámara emplea un gel (151) de 7,0 cm de ancho y 4,0 cm de largo. En el gel (151) fueron cargados trece bloques de muestra (152) de 0,25 cm de ancho, 0,07 cm de grosor y 0,2 cm de

profundidad. Los bloques de muestra (152) contenían los cromosomas intactos de *Saccharomyces cerevisiae*, los que fueron separados durante la electroforesis en los patrones de bandas (153) en cada una de las carrileras 154 del gel. Cada patrón de bandas posee once bandas. Las condiciones de electroforesis fueron 60,0 segundos de tiempo de pulso, 7,0 horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5X, 20ºC, 10,0 V/cm. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio.

Los resultados anteriores indican que la mini-cámara TAFE brinda rápidamente buena separación de las bandas en el patrón electroforético y resultados reproducibles en las diferentes carrileras del gel.

Ejemplo 14

Reproducibilidad de los patrones de bandas obtenidos en mini-cámaras CHEF

En la figura 18 se muestran los resultados de tres corridas electroforéticas en una mini- cámara CHEF de 11,6 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas. Esa cámara emplea geles cuadrados (161), (162) y (163) de 4,0 cm de lado. En los geles (161), (162) y (163) fueron cargados siete bloques de muestra (164), (165) y (166) de 0,25 cm de ancho, 0,07 cm de grosor y 0,2 cm de profundidad. Los bloques de muestra (164), (165) y (166) contenían los cromosomas intactos de *Saccharomyces cerevisiae*, los que fueron separados durante la electroforesis en los patrones de bandas (168), (169) y (170) en cada una de las carrileras (171), (172) y (173) de los tres geles (161), (162) y (163). Las condiciones de electroforesis fueron 50,0 segundos de tiempo de pulso, 3,5 horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5X, 20ºC, 9,82 V/cm. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio.

En la figura puede observarse que los patrones separados en cada gel (161), (162) y (163) poseen igual cantidad de bandas en todas las carrileras. Además, cada banda (168), (169) y (170) migró la misma distancia en las siete carrileras (171), (172) y (173) de un gel (161), (162) y (163) cualquiera. Por otro lado, en cada carrilera (171), (172) y (173) de los tres geles (161), (162) y (163) se aprecia el mismo patrón electroforético, el que posee igual número de bandas (168), (169) y (170), indicando que la mini-cámara brindó resultados reproducibles en experimentos diferentes, los que se obtuvieron en un tiempo breve de 3,5 horas.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1 a 3 son esquemas de cámaras TAFE tipo I y patrones electroforéticos.

La Figura 1 es una vista despiezada del esquema tridimensional de una cámara TAFE tipo I con su arreglo de electrodos en configuración TAFE convencional, las ranuras por donde se desliza el marco, que contiene todos los minigeles de las cuatro ZUE de la cámara y las muestras. También se muestran esquemas tridimensionales del marco, los minigeles y la tapa con los bloques que eliminan las regiones ZNU o eliminan regiones ZUE.

La Figura 2 es una vista lateral de un esquema de una cámara TAFE tipo I, de los bloques que eliminan las regiones ZNU, del ordenamiento de electrodos en configuración TAFE convencional y del bloque que ocluye las regiones ZUE que no se emplearán en una electroforesis.

La Figura 3 muestra patrones de bandas de electroforesis que brindaron los cromosomas de *S. cerevisiae* cuando fueron separados en los cuatro minigeles que emplea la cámara TAFE tipo I de la figura 1. Las moléculas fueron separadas a 8,33 V/cm, 15ºC, durante 12 horas de electroforesis en 1,5% de agarosa, y solución tampón TBE 0,5X y para 80 segundos de duración de los pulsos eléctricos. A las 7 horas se reemplazó un litro de solución tampón.

Las Figuras 4 a 7 son esquemas de las características distintivas de las cámaras TAFE tipo II.

La Figura 4 es una vista despiezada de un corte lateral de la cámara TAFE tipo II, una de sus miniplataformas de electrodos en configuración TAFE invertida con su marco y su gel y la ubicación de las muestras en la parte inferior del gel. Las miniplataformas de electrodos son desmontables.

La Figura 5 es una vista en planta de un esquema de la cámara de 3 miniplataformas de electrodos en la cual se han colocado las tres miniplataformas.

La Figura 6 es una vista en planta de un esquema de la cámara de tres miniplataformas de electrodos en la cual se ha colocado solo una miniplataforma. Las restantes se han ocluido con piezas de la forma y material apropiados.

La Figura 7 es una vista en planta de un esquema de la tapa de la cámara. Se muestran las conexiones eléctricas y las conexiones entre todas las miniplataformas de electrodos.

La Figura 8 es una vista isométrica en explosión de un esquema de una mini-cámara CHEF. Se muestran la cámara con su base de electrodos y la tapa de dicha cámara. También se muestran la base del gel cuadrado con sus pestañas, el gel y un bloque hipotético de muestras. Se aprecian desmontadas las láminas de tipo A del sistema para limitar las turbulencias del tampón. En la base de la cámara puede apreciarse una lámina de tipo B.

La Figura 9 es una vista isométrica del esquema de una mini-cámara TAFE con electrodos dispuestos en configuración TAFE invertida. En la figura, la pared delantera se dibujó transparente para que puedan apreciarse los detalles interiores de la cámara. En el centro de la cámara se observa el gel rodeado por los cuatro electrodos. A ambos lados de los electrodos se muestran las láminas ranuradas del sistema para limitar las turbulencias en el tampón que atraviesa la cámara.

La Figura 10 muestra la forma de fijar los electrodos a las paredes o a la base de las mini-cámaras TAFE y CHEF. En la parte superior se muestra un corte transversal de una parte de la base del CHEF y en la inferior de una parte de la pared del TAFE. En ellas se observa el electrodo insertado dentro del tapón horadado de silicona.

La Figura 11 es una vista posterior un esquema del conjunto de accesorios para moldear los geles con caras planas y el peine para alinear los bloques de muestra en el gel. En la parte inferior de la figura se observa la base para moldear el gel, después un esquema del gel con sus pocillos de aplicación y un bloque hipotético de muestras. Sobre el gel se encuentra la tapa delantera del molde, el marco con sus ranuras y la tapa trasera del molde. En la parte superior se muestra el esquema de un peine formador de pocillos y el peine para alinear los bloques de muestras en el gel. Las flechas indican la dirección de ensamblaje de los accesorios.

La Figura 12 muestra en la parte superior izquierda un esquema de la base con el gel cuadrado. En la parte superior derecha, se muestra la base con el gel rectangular. En la parte inferior, se muestra un esquema de una vista superior de las minicámaras CHEF. Se muestran el arreglo hexagonal de electrodos y la depresión donde se colocan las bases portadoras de los geles.

La Figura 13 muestra un esquema de un dispositivo para tensar los electrodos de las mini-cámaras TAFE. En la izquierda (A): Se muestra el vástago con el prisionero aflojado y el alambre de platino a la entrada del vástago. Las flechas indican la dirección en que se ensamblan las piezas. En la derecha (B): Se muestra el vástago con el alambre pasado y enrollado alrededor de la cintura del vástago, el vástago rotado y el prisionero apretado.

La Figura 14 es una vista lateral de un esquema del sistema limitador de turbulencias en las minicámaras CHEF donde la pared se dibujó transparente. En el centro de la figura se observa el gel horizontal. A los lados se observan las láminas de tipo A y B, colocadas alternadamente a ambos lados del gel. Las flechas indican el flujo del tampón en la cámara de electroforesis.

La Figura 15 es una vista lateral de un esquema del sistema limitador de turbulencias en las mini- cámaras TAFE donde la pared se dibujó transparente. En el centro de la figura se observa el gel vertical. A los lados se observan las láminas del sistema limitador de turbulencias colocadas a ambos lados del gel. Las flechas indican el flujo del tampón en la cámara de electroforesis.

La Figura 16 muestra un esquema del conjunto de accesorios para formar bloques de muestras de tamaños iguales y homogéneos que contienen ADN inmovilizados. En la parte inferior de la figura se presenta el manipulador de bloques de muestra e inmediatamente el aplicador de bloques de muestra en el gel. Sobre ambos se encuentra la lámina formadora de bloques de muestras con sus ranuras longitudinales y un grupo de tiras de agarosa solidificada y cortadas en bloques. También se presentan tiras de agarosa solidificadas y sin cortar. La tapa del bloque se encuentra más arriba. En la parte superior de la figura se observa el cortador de bloques de muestras y otro grupo de bloques ya cortados.

La Figura 17 muestra patrones electroforéticos obtenidos en una mini-cámara TAFE. Se separaron los cromosomas de muestras de ADN intacto de *Saccharomyces cerevisiae*, inmovilizados en trece bloques de agarosa. Condiciones de electroforesis: 60 s de tiempo de pulso, siete horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5X, 20ºC, 10,0 V/cm. El gel es de 4,0 cm de longitud y 7,0 cm de ancho. Tinción del gel con bromuro de etidio.

La Figura 18 muestra los patrones electroforéticos obtenidos en tres experimentos diferentes en una mini-cámara CHEF. En cada experimento, se separaron los cromosomas de muestras de ADN intacto de *Saccharomyces cerevisiae*, inmovilizados en siete bloques de agarosa. Condiciones de electroforesis: 50,0 segundos de tiempo de pulso, 3,5 horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5X, 20ºC, 9,82 V/cm. Se empleo el gel cuadrado de 4,0 cm. Tinción del gel con bromuro de etidio.

Ventajas de las soluciones propuestas

Las cámaras de electroforesis de campos pulsantes, accesorios y el procedimiento desarrollados y descritos en esta invención presentan las siguientes ventajas:

1- Brindan cámaras que consumen poco espacio de laboratorio y poca cantidad de reactivos químicos y biológicos. Es decir, emplean poca cantidad de solución tampón y poca muestra biológica.

2- Se brinda un procedimiento para construir las mini-cámaras de tipo CHEF y TAFE, moldeando los geles y calculando el volumen de solución tampón a emplear. El procedimiento sólo necesita ser alimentado con la separación entre los electrodos de polaridades opuestas.

3- A pesar de que las cámaras emplean poco volumen de tampón y permiten la circulación del tampón a alta velocidad de flujo para homogeneizar la conductividad de la solución, en ellas se obtienen patrones de bandas reproducibles, en virtud de que poseen un sistema para atenuar de turbulencias de la solución tampón a través de las cámaras.

4- Al proveerse cámaras pequeñas, en ellas se pueden aplicar campos eléctricos altos usando fuentes de poca potencia, por lo que la electroforesis se hace en poco tiempo. Como norma general, los tiempos de electroforesis para separar moléculas de hasta 2 mega pares de bases son de aproximadamente 8 horas.

5- Los accesorios para moldear los geles y cargar los bloques de muestras permiten moldear geles de caras planas y cargar los bloques de muestras perfectamente alineadas. Esto unido a que la solución empleada puede hacerse circular a una velocidad de flujo sin que se formen turbulencias contribuye a obtener patrones de bandas rectos y repetitivos.

6- El sistema de tensar los electrodos evita ondulaciones en los electrodos y por tanto, evita que ocurra distorsión de las líneas de fuerza del campo eléctrico, contribuyendo así a la reproducibilidad de los patrones de bandas.

7- El sistema de tensión de electrodos facilita, además, que los electrodos del TAFE puedan ser tensados por el experimentador cuando pierden tensión con el uso. El sistema de tensión también tiene asociado un sistema de tapones elásticos que sellan los orificios por donde pasan los electrodos, lo que evita la fuga de solución tampón aunque el diámetro de los electrodos se reduzca a causa del desgaste.

8- Se brinda un conjunto de accesorios para preparar bloques de muestra delgados de dimensiones que coinciden con los huecos de los pocillos de los geles.

9- El sistema de colocar los electrodos en las cámaras permite ahorrar alambre de platino. Ya que las cámaras son pequeñas, también se ahorran los demás materiales empleados en su construcción, disminuyendo los costos.

10- Se proporciona un procedimiento para determinar los tiempos de electroforesis para diferentes condiciones experimentales. El procedimiento se basa en ecuaciones que describen la migración de moléculas de ADN en cámaras CHEF en electroforesis de gel de campo pulsante.

11- Los geles que emplean las mini-cámaras son lo suficientemente grandes para brindar los patrones de bandas bien resueltos y así ser útiles en aplicaciones analíticas y preparativas. También son lo suficientemente anchos para admitir ser cargados con numerosas muestras en un solo experimento.

12- Las cámaras soportan la existencia de numerosas ZUE, que pueden ser activadas u ocluidas según requiera el experimento. Tanto las cámaras TAFE tipo I como tipo II pueden poseer varias ZUE, por lo que admiten más de un minigel y pueden analizar pocas o numerosas muestras. En las cámaras tipo I y II, la cantidad máxima de muestras “Nt” que pueden ser analizadas en una electroforesis es un múltiplo del número de ZUE de la cámara.

13- La coelectroforesis de pocas o numerosas muestras se realiza en poco tiempo. Tanto las cámaras TAFE tipo I como tipo II pueden separar las moléculas de ADN contenidas en múltiples muestras de manera rápida. Por ejemplo, cuando se emplean cuatro minigeles, 80 segundos de duración del pulso, 8,33 voltios/cm y 15ºC, solo se requieren 12 horas para separar los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae*.

14- La cantidad de reactivos que emplean las cámaras TAFE tipo I y II depende de la cantidad de muestras que se deseen analizar y por tanto de la cantidad de ZUE que se activen (“Nzue”). Se cumple que el volumen de reactivos que se coloca en la cámara es Bc = Nzue * Bnt.

15- Las ecuaciones que permiten diseñar de modo óptimo las dimensiones de cámaras TAFE y seleccionar los valores máximos de campo eléctrico que pueden ser aplicados en ellas. El campo eléctrico máximo que puede aplicarse depende de la longitud de los electrodos en las cámaras TAFE tipo I y de la cantidad de miniplataformas que se activarán en las cámaras tipo II, siempre que el resto de los parámetros de la ecuaciones se mantengan constantes y se seleccione adecuadamente la fuente de potencia.

16- Tanto las cámaras TAFE tipo I como tipo II pueden emplear menos volumen de solución tampón, ya que pueden eliminarse las regiones ZNU por donde pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan sobre el movimiento de las moléculas.

17- Las cámaras con los electrodos dispuestos en configuración TAFE invertida son simples de construir y facilitan la manipulación de los minigeles durante los experimentos.

18- Los minigeles de las cámaras TAFE tipo I y II emplean muestras delgadas, por lo que ahorran reactivos biológicos y reducen el tiempo de electroforesis.

19- Las cámaras con múltiples ZUE son útiles para realizar estudios de epidemiología molecular, análisis de ceparios, analizar clonajes en vectores YAC y BAC y cualquier otra aplicación que involucre gran cantidad de muestras.

REIVINDICACIONES

1. Cámaras de electroforesis de campo pulsado con conjuntos de electrodos tipo TAFE (Electroforesis de Campo Alternativo Transversal, "Transversal Alternating Field Electrophoresis") o CHEF (Campo Eléctrico Homogéneo con Contornos Fijados, "Contour Clamped Homogeneous Electric Field") para la separación de moléculas de ADN cargadas en geles empleando un sistema para energizar sus electrodos y alternar la dirección de aplicación de los campos eléctricos generados por el conjunto de electrodos, así como un sistema para hacer circular el tampón, en donde dichas cámaras comprenden,

i) un minigel o varios minigeles colocados en las zonas que son atravesadas por las líneas de fuerza del campo eléctrico que interactúan directamente con las moléculas cargadas en dicho minigel(s), siendo las zonas zonas útiles de electroforesis (ZUE) de la cámara,

ii) pares de electrodos de polaridades opuestas separados en el conjunto de electrodos a una distancia "d", que es de 6,2 a aproximadamente 15 cm, y donde la separación 'd' en relación con el número y tamaño de la ZUE limita la altura, profundidad y ancho de la cámara a ciertos valores, y también limita el tamaño del minigel(s), y el número total de muestras que pueden cargarse simultáneamente en todos los minigeles colocados en dicha cámara,

iii) bloques de un material con una elevada constante dieléctrica de oclusión de las zonas de dicha cámara, que son atravesados por las líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan sobre las moléculas cargadas en el minigel(s), las zonas que son las zonas no útiles de electroforesis (ZNU) de la cámara;

iv) electrodos extendidos, que se habían tensado por la acción de un sistema de fijación en las cámaras de CHEF y de un sistema de fijación y de tensión en el TAFE;

v) matriz o matrices de electrodos (s) del sistema de TAFE que tiene el ánodo en la parte inferior de la cámara y el cátodo en la parte superior de la cámara (configuración de electrodos TAFE invertida)

vi) tres conjuntos de accesorios de dichas cámaras CHEF y TAFE por lo que se homogeneiza el flujo de corriente eléctrica a través de las cámaras; el primer conjunto está formado por placas rectangulares extraíbles que ocupan partes de dichas cámaras, las hojas mediante las cuales el tampón se hace circular a una alta velocidad de flujo, la segunda comprende dispositivos desmontables formados por marcos, placas base, tapas y peines, instrumentos mediante los cuales los minigeles de dichas cámaras se moldean con un área transversal homogénea, y la tercera comprende los sistemas desmontables de bloques, tapas y cortadores, mediante el cual se moldean los minibloques de muestra de dichos minigeles;

estando dichas cámaras CHEF y TAFE y sus conjuntos de accesorios completamente ensamblados y se utilizan de acuerdo con procedimientos específicos de utilización, cámaras en las que la separación de moléculas de ADN se realiza de acuerdo a los procedimientos para realizar la electroforesis en dichas cámaras, comprendiendo los procedimientos de uso varios pasos.

2. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que las cámaras CHEF poseen una ZUE única que puede soportar un minigel con forma rectangular o cuadrada.

3. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 2 en las que las dimensiones del minigel rectangular que se emplea en las cámaras CHEF son d/3 centímetros de longitud y d/1,732 centímetros de ancho (a), siendo el ancho de 3,6 a aproximadamente 8,7 cm y la longitud de 2,1 a aproximadamente 5 cm.

4. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 2 en las que la longitud y el ancho "a" del minigel con forma cuadrada de las cámaras CHEF es de d/3 centímetros, siendo "a" de 2,1 a aproximadamente 5 cm.

5. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que las bases de las cámaras CHEF que comprenden la ZUE poseen un área igual a [2+ (d/0,87)] · [6+d], siendo dicha área de aproximadamente 111,3 a aproximadamente 404,1 cm^2, mientras que las partes restantes de la base de dicha cámara están cubiertas con bloques de materiales de elevada constante dieléctrica.

6. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que las cámaras con un conjunto de electrodos TAFE tienen una pared frontal rectangular con el lado más largo paralelo a cualquier electrodo del conjunto y hasta 50 cm de longitud ("L"), cámara que soporta un minigel en una ZUE única o más minigeles en las ZUE formadas dividiendo la longitud del lado más largo de dicha pared de la cámara y los electrodos del conjunto.

7. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que la longitud de los minigeles de las cámaras TAFE es d · 0,515 centímetros, longitud que es de 3,2 a aproximadamente 7,7 cm.

8. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que un minigel de las cámaras CHEF o TAFE tiene "N" pocillos que soportan "N" como el número máximo de minibloques, siendo N igual a (a-0,2)/0,25, y "a" el ancho de minigel, que es de 1,7 a 50 cm en TAFE.

9. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que el área correspondiente a la ZUE en las paredes laterales de la cámara TAFE, o las paredes que soportan el gel y los electrodos, es igual a $[2+1,4 \cdot d] \cdot [2+0,54 \cdot d] - 1,02 \cdot [1+0,54 \cdot d]^2$, donde los valores de las áreas están comprendidos entre 37,8 y 149,5 cm^2, mientras que las partes de dichas paredes laterales que corresponden a la ZNU están bloqueadas con piezas de elevada constante dieléctrica.

10. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que las cámaras TAFE se subdividen uniformemente en varias ZUE con un minigel en cada una, minigeles que se colocan a lo ancho en tándem, secuencialmente uno al lado del otro, con sus caras paralelas a los electrodos.

11. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que las cámaras TAFE poseen una plataforma de electrodos fija o desmontable única que contiene el conjunto de electrodos (cámara TAFE de tipo I) siendo "L" la longitud de dichos electrodos hasta 50 cm.

12. Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones 1 u 11 en las que la cámara TAFE de la plataforma de electrodo único de tipo I está subdividida uniformemente y forma varias ZUE con todos los minigeles soportados en un solo marco.

13. Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones 1 u 11 en las que la cámara TAFE de la plataforma de electrodo único de tipo I está subdividida uniformemente y forma varias ZUE colocándose cada minigel independientemente en una ZUE, para lo cual la dichas cámaras deben poseer piezas ranuradas lateralmente por donde se deslizan dichos minigeles.

14. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que una cámara TAFE posee diversas miniplataformas independientes fijas o desmontables de un conjunto de electrodos con un minigel cada una, plataformas en las que la zona útil para electroforesis (ZUE) está limitada y que comprenden electrodos físicamente separados de los electrodos de las restantes plataformas de dicha cámara, pero que pueden conectarse en paralelo con ellos para adquirir continuidad, de manera que cuando la cámara se energiza con una sola fuente de potencia, todas las muestras cargadas en todos los minigeles de las plataformas estén sometidas a las mismas condiciones de electroforesis (cámara TAFE de tipo II).

15. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que una cámara TAFE tiene piezas de la forma apropiada hechas de cualquier material con elevada constante dieléctrica, piezas que ocupan y ocluyen totalmente las regiones de la cámara que corresponden a las zonas útiles para electroforesis (ZUE) y que son tantas como las necesarias para analizar el número de muestras deseado en la cantidad mínima de ZUE.

16. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que las cámaras TAFE poseen de 1 a 30 ZUE y soportan de 1 a 30 minigeles.

17. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que dichas cámaras TAFE pueden tener configuración TAFE invertida, configuración en la que los cátodos de las miniplataformas están en el fondo de la cámara de electroforesis y los ánodos en su parte superior, cargándose por tanto las muestras en la parte inferior del minigel, de manera que las muestras migran en el sentido contrario al de la fuerza de gravedad.

18. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que las cámaras TAFE poseen paredes externas paralelas al plano imaginario que contiene el cátodo de un campo eléctrico y el ánodo del otro campo eléctrico, siendo estas paredes las que no soportan los electrodos, y colocándolas como máximo a 2 cm de dicho plano imaginario, o bloques hechos de materiales con elevada constante dieléctrica que ocupan las partes de la cámara que corresponden las zonas no útiles para electroforesis (ZNU).

19. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que los electrodos que se mantienen fijos por la acción de un sistema de fijación en las cámaras CHEF y TAFE, entran dentro de la cámara desde el exterior, se energizan con una sola fuente de potencia durante la electroforesis y entran en contacto con el tampón que pasa a través de las perforaciones de los tapones elásticos insertados en los orificios perforados en la base de las cámaras CHEF o en las paredes de las cámaras TAFE que soportan el gel, usándose dichos tapones para fijar los electrodos a la cámara.

20. Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 19 en las que los tapones elásticos a través de los que pasan los electrodos pueden ser de silicona, goma u otro material elástico cualquiera.

21. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que las cámaras TAFE poseen un sistema de tensión de los electrodos que atraviesan las paredes de dicha cámara, sistema que se coloca en la salida de cada electrodo, estando comprendido dicho sistema por:

i) un vástago ranurado en su parte superior, vástago que gira y posee una muesca en forma de cintura, que está atravesada por un orificio, en el que se inserta el extremo de un electrodo y se dobla para que rodee la cintura del vástago,

ii) un prisionero que inmoviliza definitivamente al vástago en la posición deseada.

22. Empleo de las cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 21 en el que el procedimiento de empleo del sistema de fijación y tensión de los electrodos de las cámaras TAFE comprende los siguientes pasos:

i) se afloja el prisionero que fija la varilla en la que se inserta el electrodo,

ii) se gira la varilla el ángulo necesario para tensar dichos electrodos,

iii) se aprieta el prisionero para ajustar la varilla en la posición que mantiene el electrodo estirado.

23. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que el conjunto de láminas rectangulares extraíbles de las cámaras CHEF tiene dos tipos de láminas rectangulares: los tipos "A" y "B", hechas ambas de un material de elevada constante dieléctrica, láminas cuyos lados más largos son tan anchos como el ancho de la cámara, y los otros lados son de al menos 2 cm de altura en la lámina de tipo "A" y de 0,5 cm en el tipo "B".

24. Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 23 en las que las láminas de tipo "A" se colocan sobre la base de la cámara sobresaliendo desde la superficie de la solución tampón, las láminas sobre la base están separadas de la misma de 0,02 a aproximadamente 0,05 cm y forman un hueco entre sus bordes inferiores y la base, hueco a través del cual sólo puede circular la solución tampón.

25. Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 23 en las que las láminas de tipo B están pegadas a la base de la cámara y sumergidas totalmente en la solución tampón de tal forma que al circular el tampón en la cámara este fluye solamente por encima de las láminas de tipo "B".

26. Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 23 en las que las ambos tipos de láminas (A y B) se ubican alternativamente en la entrada y en la salida de la solución tampón hacia el conjunto de electrodos, colocación hecha en el siguiente orden: una lámina de tipo A seguida de una lámina de tipo B, repitiendo "n" veces ese par de láminas, donde "n" es un número entero entre 1 y 4 y colocando la última lámina aproximadamente a 1 cm de los electrodos y siendo dicha última lámina de tipo A.

27. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que el conjunto de láminas rectangulares extraíbles de las cámaras TAFE son dos láminas idénticas hechas de un material de elevada constante dieléctrica, láminas similares a las paredes de la cámara y colocadas en paralelo con el plano que contiene los electrodos del mismo lado que el gel, estando dichas láminas ranuradas horizontalmente hasta 0,5 cm en su tercio inferior, y siendo la ranura tan grande como el ancho de la cámara o el minigel.

28. Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 27 en las que las dos láminas extraíbles de las cámaras TAFE están colocadas de la siguiente manera: una cerca de la entrada de tampón y la otra cerca de la salida, láminas que dividen la cámara en tres compartimentos: el central, que contiene la ZUE, y dos laterales a través de los cuales se suministra el tampón a la cámara o se extrae de la misma.

29. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que el conjunto de dispositivos desmontables para moldear minigeles, dispositivos formados por marcos, placas base, tapas y diversas piezas con forma de peine con dientes de idéntico ancho e idéntico espesor cada uno, que están comprendidos por:

i) una placa base plana,

ii) dos marcos con dos muescas para insertar los peines, marcos de 0,35 a aproximadamente 0,5 cm de espesor con cavidades de forma rectangular o cuadrada que determinan la forma, espesor, longitud y ancho "a" de los minigeles moldeados en los mismos; minigeles que son el medio de soporte en la electroforesis en las cámaras CHEF o TAFE,

iii) un peine de dientes largos con el que se forman los pocillos en el minigel, pocillos en los que se cargan los minibloques de muestras,

iv) dos tapas, una tapa 1 que encaja en la parte delantera del peine y una tapa 2 que encaja en la parte trasera del peine,

v) otro peine similar al peine de dientes largos, pero de dientes más cortos, para empujar y alinear los minibloques de muestras en los pocillos del minigel.

30. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 29 en las que el peine de dientes largos en su parte anterior es liso mientras que en su parte posterior y por encima de los dientes está engrosado formándose un escalón, siendo dichos dientes de tamaños idénticos, que son de: espesor de 0,03 a aproximadamente 0,1 cm, ancho de 0,15 cm al ancho del minigel "a" menos 0,3 cm (a - 0,3), y longitud igual al espesor (e) del minigel menos 0,1 cm (e - 0,1).

31. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 29 en las que el peine de dientes cortos posee la misma forma y dimensiones que el de dientes largos excepto que la longitud de los dientes es aproximadamente 0,2 cm menor.

32. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 29 en las que la tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine, posee dos caras planas y en un borde sobresaliente, mientras que la tapa 1, que encaja en la parte delantera del peine, tiene dos caras planas pero uno de sus bordes está rebajado en forma de cuña.

33. Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en las que el conjunto del sistema desarmable de bloques, tapas y cortadores para formar los minibloques de muestras de dichos minigeles está comprendido por:

i) varios formadores de bloques de muestras que consisten cada uno en un bloque impermeable plano con espesor mayor de 0,5 cm, bloque que posee múltiples ranuras paralelas a todo su largo, siendo el ancho de cada ranura de 0,2 cm, y su profundidad igual al espesor de los dientes de un peine dado, siendo dicha profundidad de 0,03 a aproximadamente 0,1 cm, existiendo formadores de bloques para todos los posibles espesores de los dientes de los peines de dientes largos que pueden emplearse para formar pocillos en el minigel,

ii) una lámina plana, rígida e impermeable de al menos 0,1 cm de espesor que actúa como tapa de los formadores de bloques de muestras,

iii) varios cortadores de bloques de muestras, donde cada uno es una barra tan o más larga que las ranuras del formador de bloques de muestras, teniendo dichos cortadores patas en sus extremos que les confiere la forma de una "U" invertida, teniendo dichos cortadores en su parte inferior varias protuberancias con bordes afilados, sobresaliendo dichas protuberancias 0,1 cm desde la barra, siendo dichos bordes afilados transversales respecto a la dimensión más larga de la barra y de 0,2 cm de longitud, estando dichos bordes cortantes separados uniformemente una distancia específica que es de aproximadamente 0,15 cm hasta el ancho del gel menos 0,3 cm.

34. Uso de las cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el procedimiento de uso del sistema desarmable de tapas y cortadores de bloques para preparar minibloques de muestras con tamaños (profundidad, ancho y espesor) similares a los tamaños de los pocillos del minigel, comprende los siguientes pasos:

i) se prepara una suspensión de células en agarosa fundida y se mantiene a 45ºC,

ii) se pre-calienta el bloque ranurado del formador de bloques de muestras y su tapa a 45ºC,

iii) se vierte dicha suspensión en las ranuras del bloque,

iv) se cubre el bloque ranurado con su tapa y el conjunto se mantiene a temperatura ambiente o a una temperatura menor hasta que la agarosa solidifica,

v) se alinean los cortadores de bloques de muestra a lo largo de su longitud en la primera ranura del bloque con sus bordes afilados sobresalientes volteados hacia abajo,

vi) se presiona hacia abajo el cortador de bloques de muestras y luego se retira del conjunto,

vii) se inclina bloque ranurado y los bloques de muestras se empujan hacia el interior de un recipiente que contiene la solución apropiada para su tratamiento,

viii) se repite el procedimiento para todas las tiras de agarosa que solidificaron en todas las ranuras del bloque.

35. Uso de las cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el procedimiento de uso del dispositivo desarmable formado por marcos, placas base, tapas y peines con el que los minigeles de la ZUE de dicha cámara se moldean con un área transversal homogénea comprende las siguientes etapas:

i) se coloca el marco sobre la base plana,

ii) se encajan las patas del peine de dientes largos en las muescas que posee el marco, o las muescas realizadas en los lados externos del marco,

iii) se pone la tapa 1 sobre el marco y por delante del peine, con la cara plana volteada hacia el marco, la cara rebajada contra el peine,

iv) se sujeta el conjunto hasta que los intersticios se sellan,

v) se mantiene el gel fundido entre 65 y 70ºC

vi) se vierte el gel fundido en la cavidad, llenando la cavidad formada entre el marco, la base plana y la tapa 1,

vii) se coloca la tapa 2 sobre el marco, introduciendo el reborde sobresaliente de la tapa en el escalón trasero del peine de dientes largos, eliminando de esta manera el exceso de agarosa fundida,

viii) se deja el sistema en reposo hasta que el gel solidifica,

ix) se retira el peine de dientes largos, dejando los pocillos del ancho y espesor deseados formados en el gel,

x) se cargan los bloques de muestras sobre la rebaja en forma de cuña de la tapa 1, y se empujan dichos bloques con un aplicador para hacerlos resbalar hacia los pocillos,

xi) se coloca el peine de dientes cortos en el conjunto, fijando en las muescas del marco las patas de dicho peine, empujando después dichos bloques de muestras al fondo de los pocillos,

xii) se retira la tapa 1, la tapa 2 y el marco del conjunto.

36. Uso de las cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el procedimiento para realizar la electroforesis en las cámaras TAFE que tienen varias ZUE para analizar un número "x" de muestras, comprende los siguientes pasos:

i) se define el número mínimo de ZUE (o minigeles) requerido para cargar el número "x" de muestras (x es un número entero) en la cámara,

ii) se ocluyen las ZUE que no se utilizarán en la electroforesis para analizar el número "x" de muestras

iii) se conectan en paralelo los electrodos de las ZUE que se energizarán (activarán), si se usa una cámara TAFE con varias plataformas de electrodos (cámara de tipo II).

37. Uso de las cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en el que es necesario llenar dichas cámaras TAFE con solución tampón hasta un nivel que sobrepase el espesor del gel en al menos 0,3 cm para realizar la electroforesis, consiguiéndose por adición del tampón a la cámara, volumen de tampón que se calcula a partir del conocimiento de "d", o separación entre los electrodos de polaridades opuestas en el conjunto, de acuerdo con la fórmula $\{[2 + (d/\cos(30º))] \cdot [6 + d]\} \cdot (0{,}3 +$ espesor del gel), siendo el volumen añadido a la cámara de aproximadamente 72,3 a aproximadamente 323,3 ml de la misma si los geles son de 0,35 a 0,5 cm de espesor.

38. Uso de las cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en el que es necesario llenar dichas cámaras TAFE con solución tampón hasta un nivel que sobrepase la altura del gel en al menos 0,3 cm para realizar la electroforesis, consiguiéndose por adición del tampón a la cámara, volumen que puede conocerse a partir del conocimiento de "d", o separación entre los electrodos de polaridades opuestas en el conjunto, y el número de ZUE activas ("$NZUE_{activas}$") en la cámara de acuerdo con la fórmula $[(2+1{,}4 \cdot d) \cdot (2+0{,}54 \cdot d)-1{,}02 \cdot (1+0{,}54 \cdot d)^2] \cdot L \cdot NZUE_{activas}/NZUE_{total}$, estando esos valores comprendidos entre 63,2 y 7390 ml.

39. Uso de las cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las cámaras CHEF y TAFE de ZUE activa única admiten activación a potencias de campo eléctrico de hasta 16 o 25 V/cm respectivamente, siempre que las cámaras se activen usando fuentes de potencia con una salida de potencia máxima de 300 vatios, y que la solución de tampón se mantenga a una temperatura constante, que puede ser de aproximadamente 4 a aproximadamente 30ºC.

40. Uso de las cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicación 1 ó 36 en el que las cámaras TAFE de varias ZUE activas admiten activación a potencias de campo eléctrico de 8 a 25 V/cm, campo eléctrico que depende del número de ZUE activadas, siempre que el tampón se mantenga a una temperatura constante que puede ser de 4 a 30ºC.

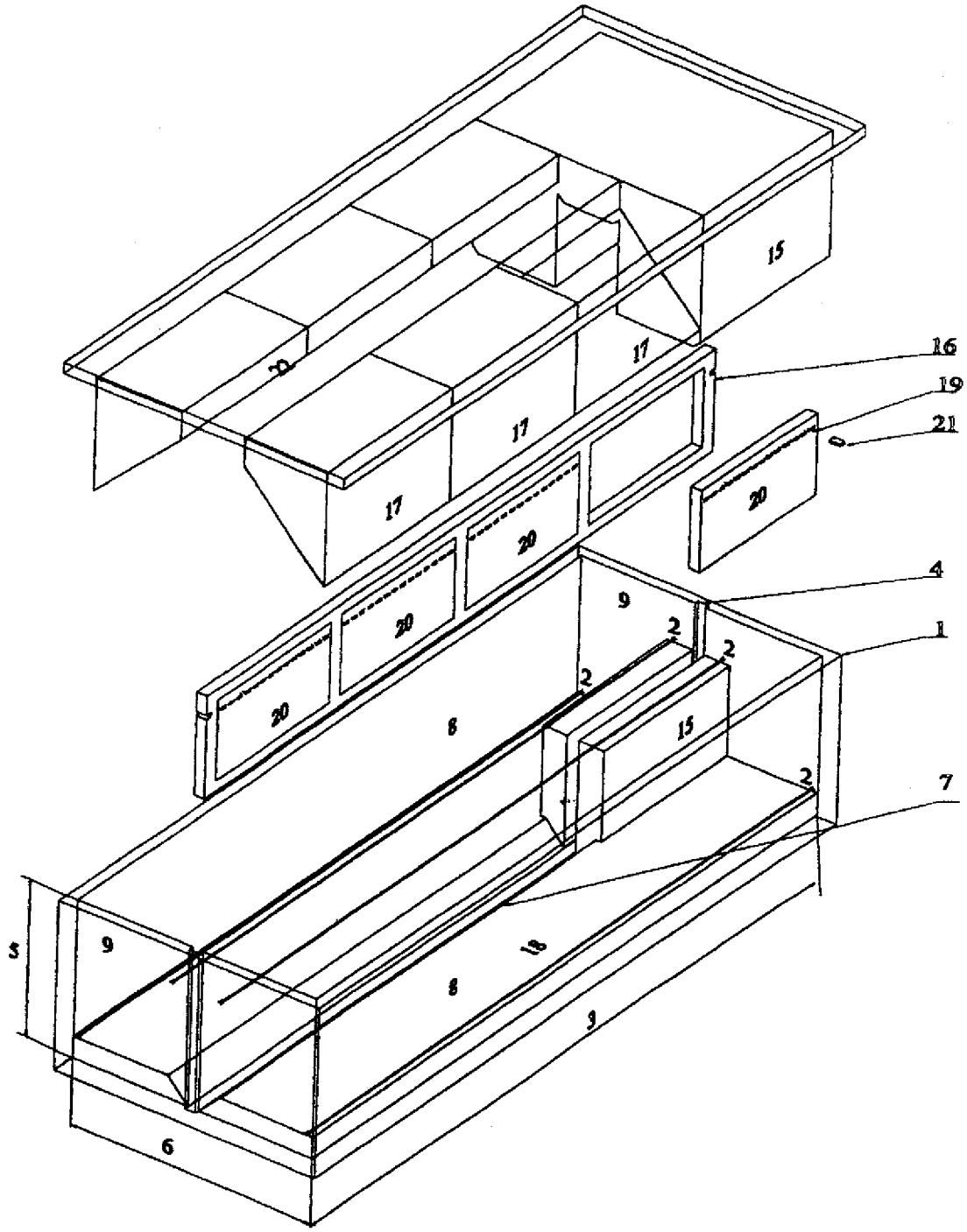


Figura 1

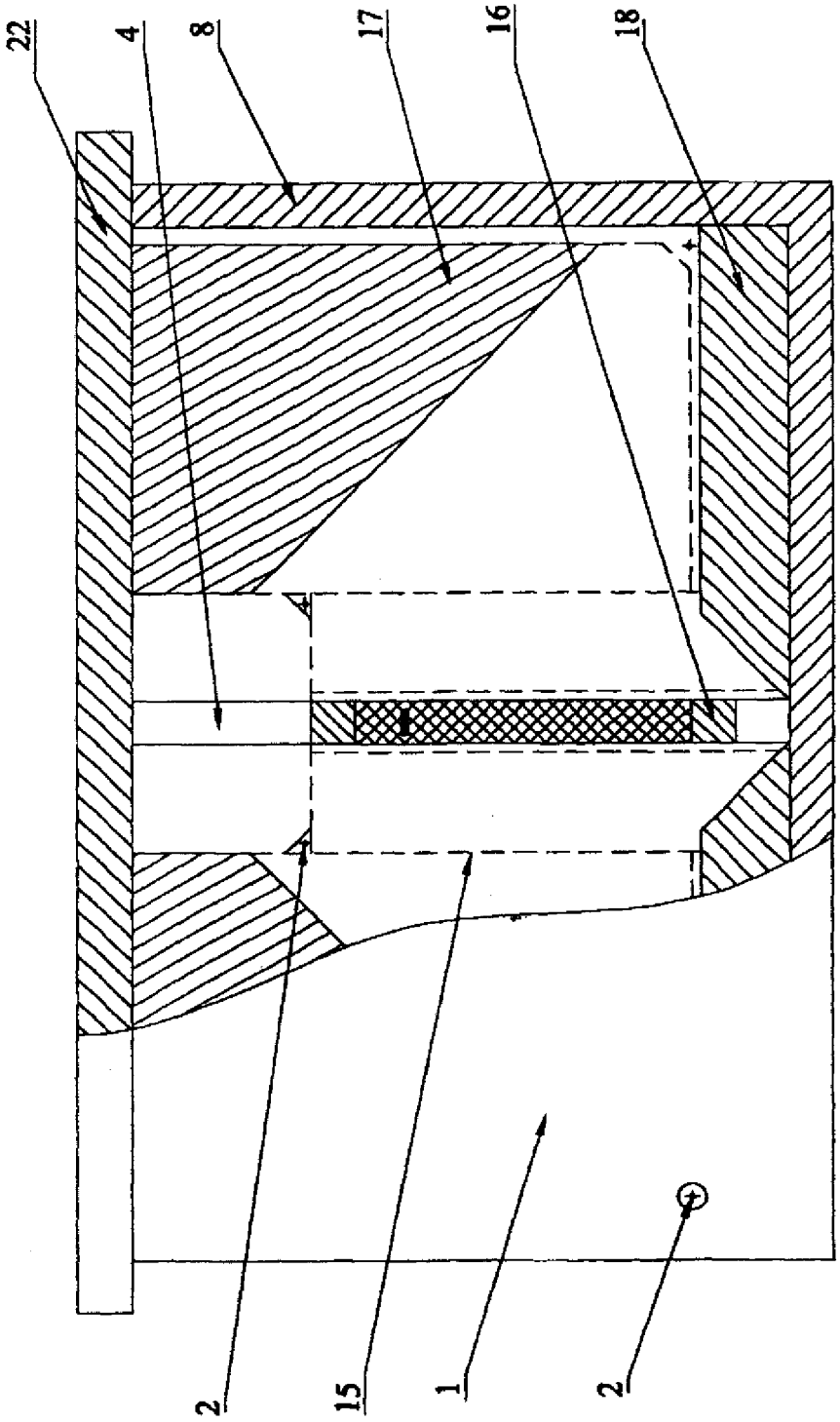


Figura 2



Figura 3

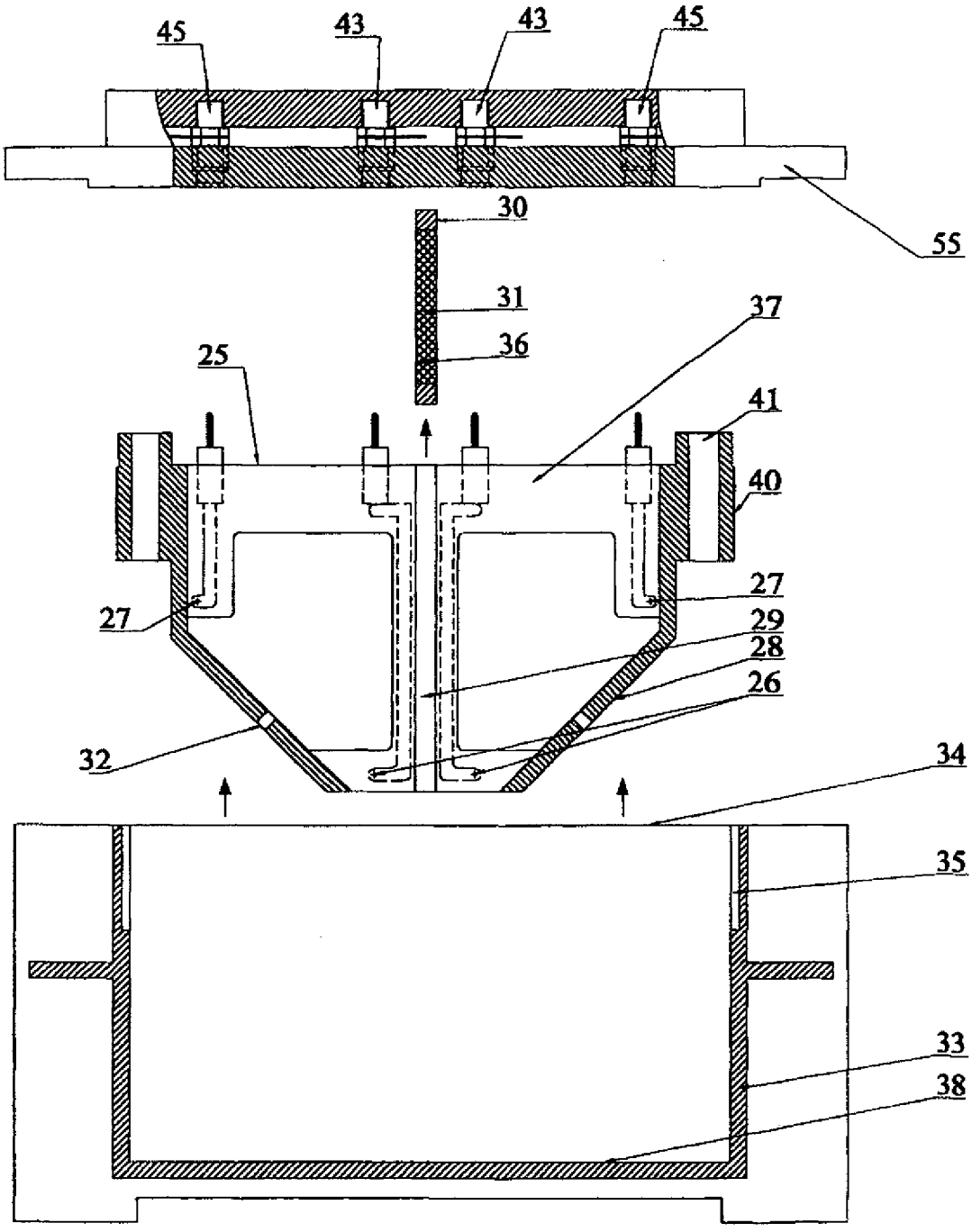


Figura 4

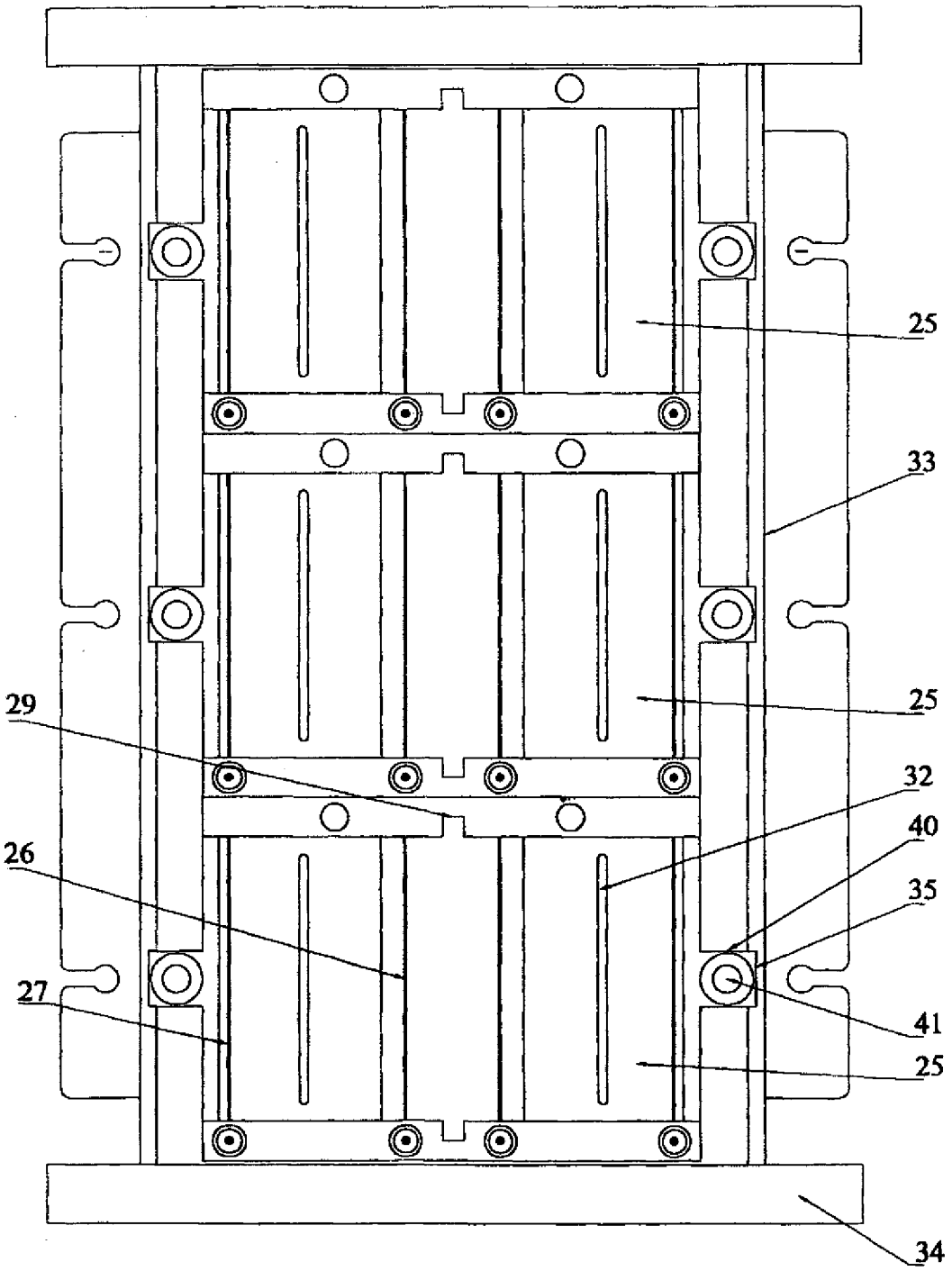


Figura 5

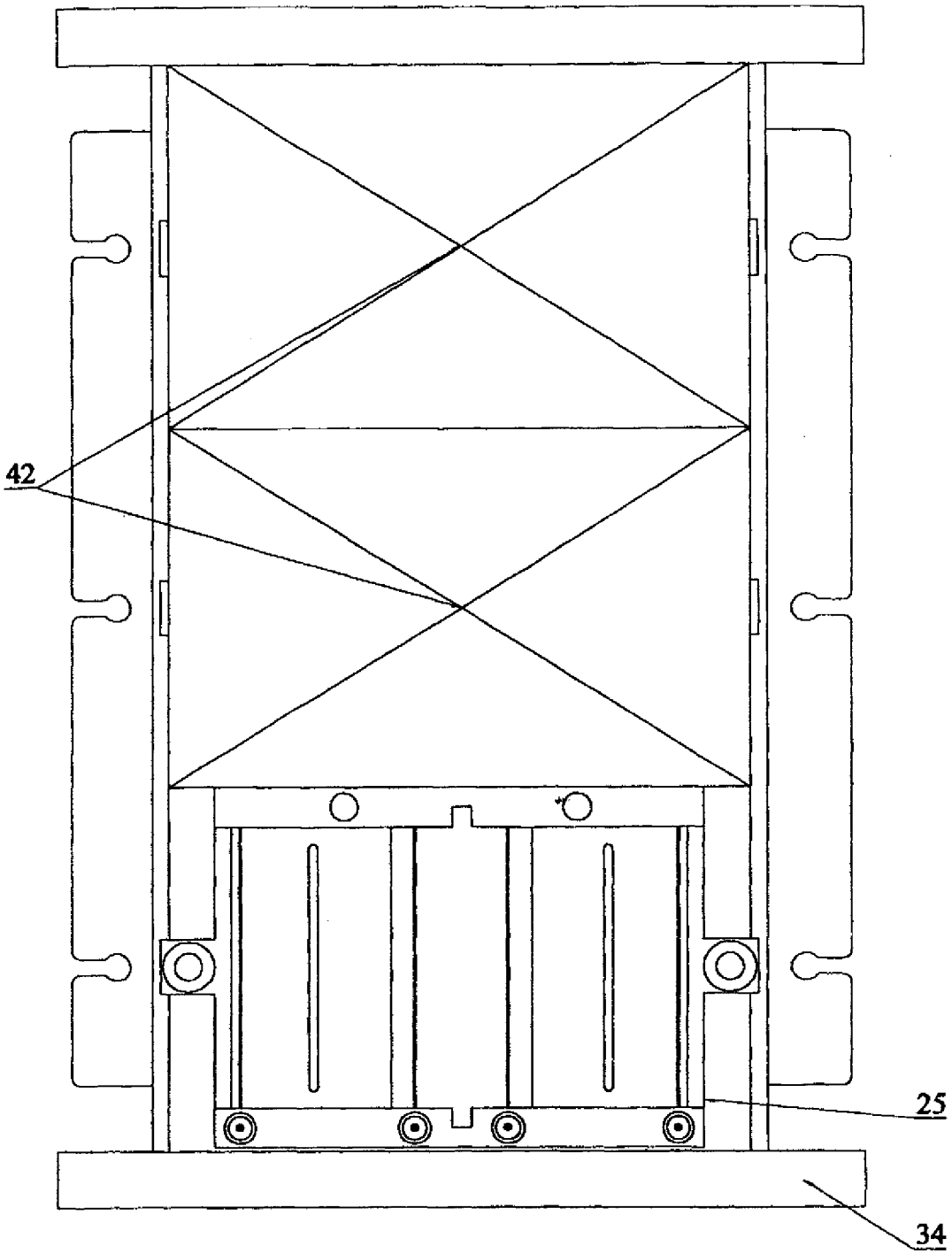


Figura 6

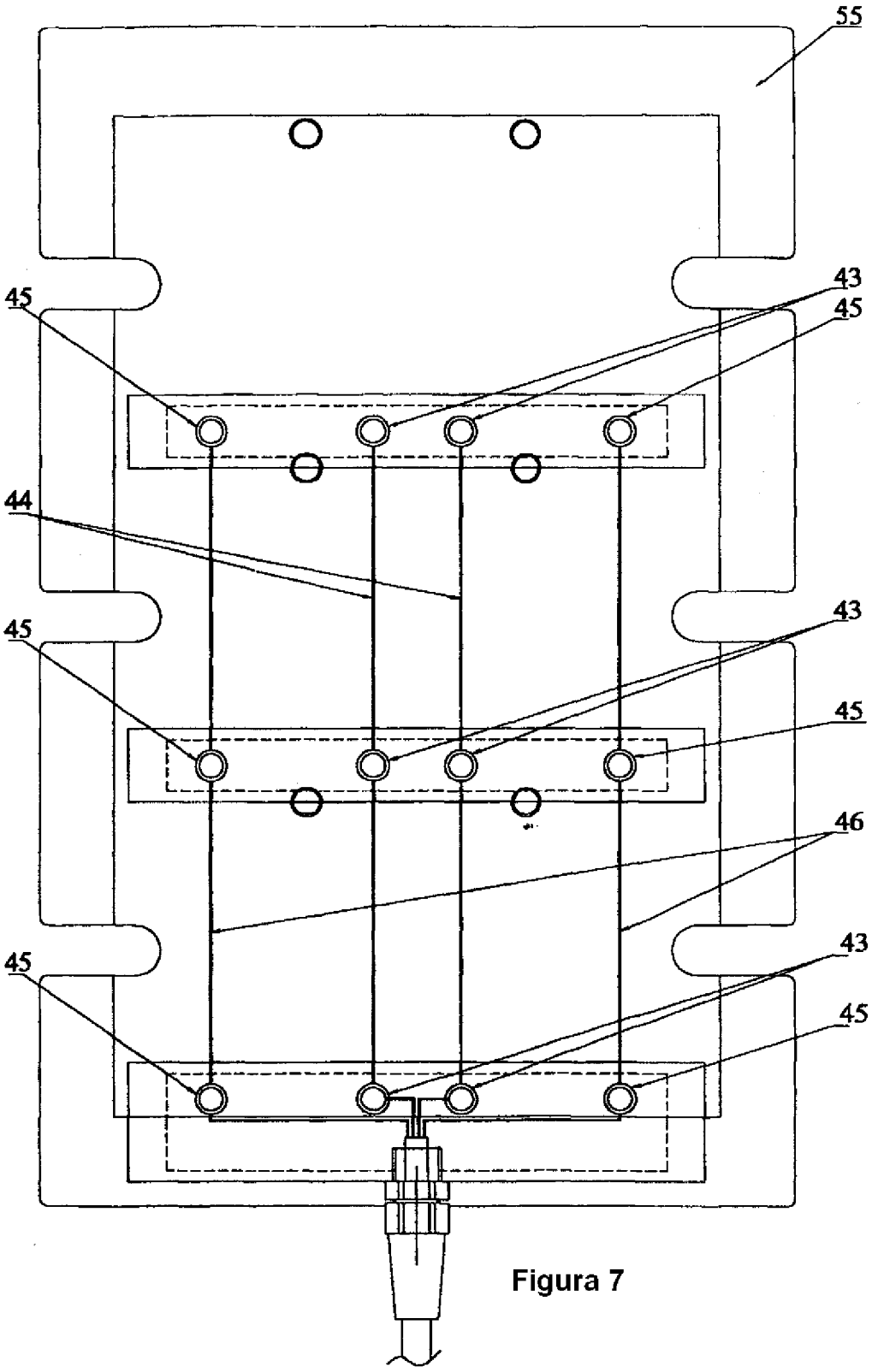


Figura 7

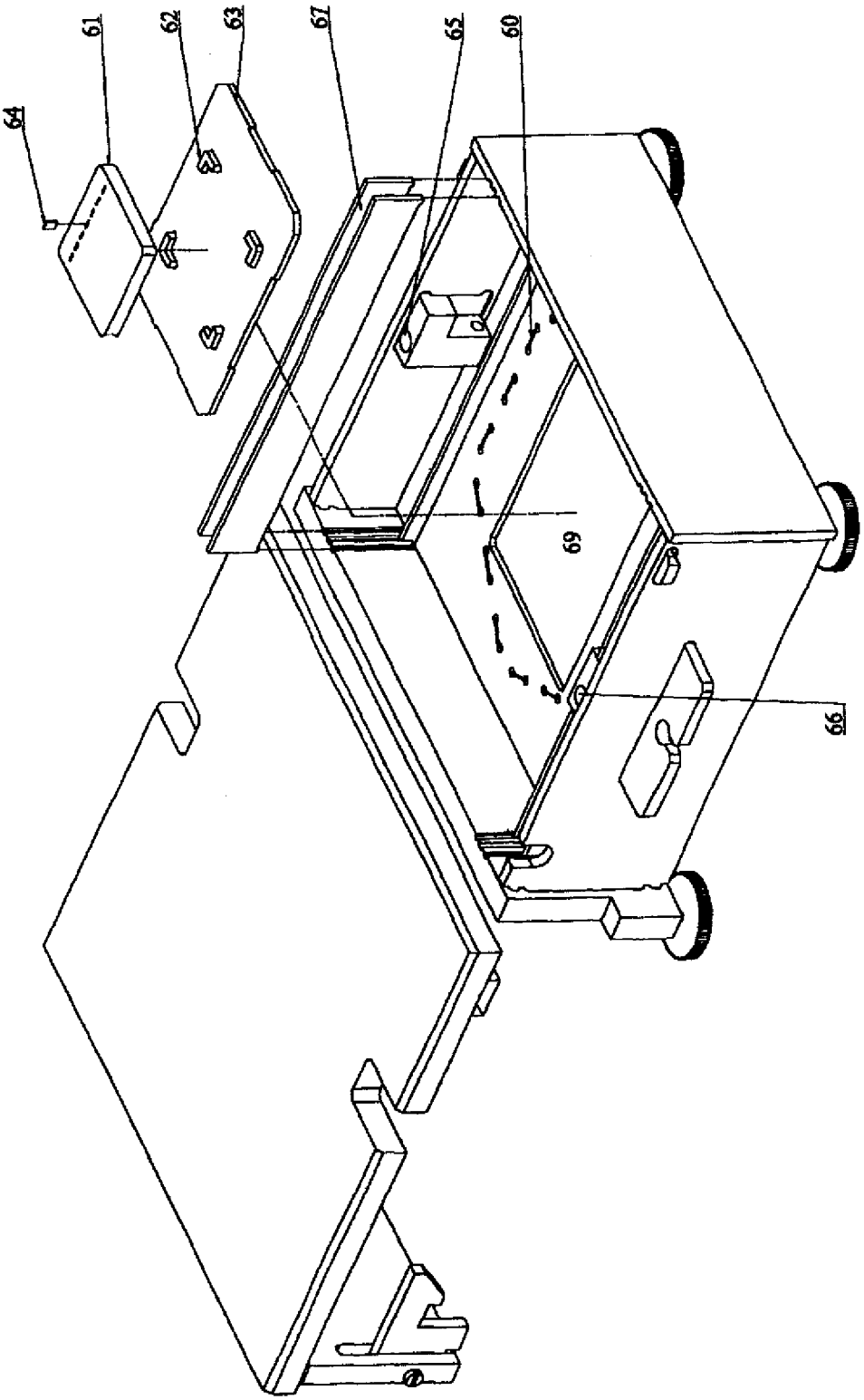


Figura 8

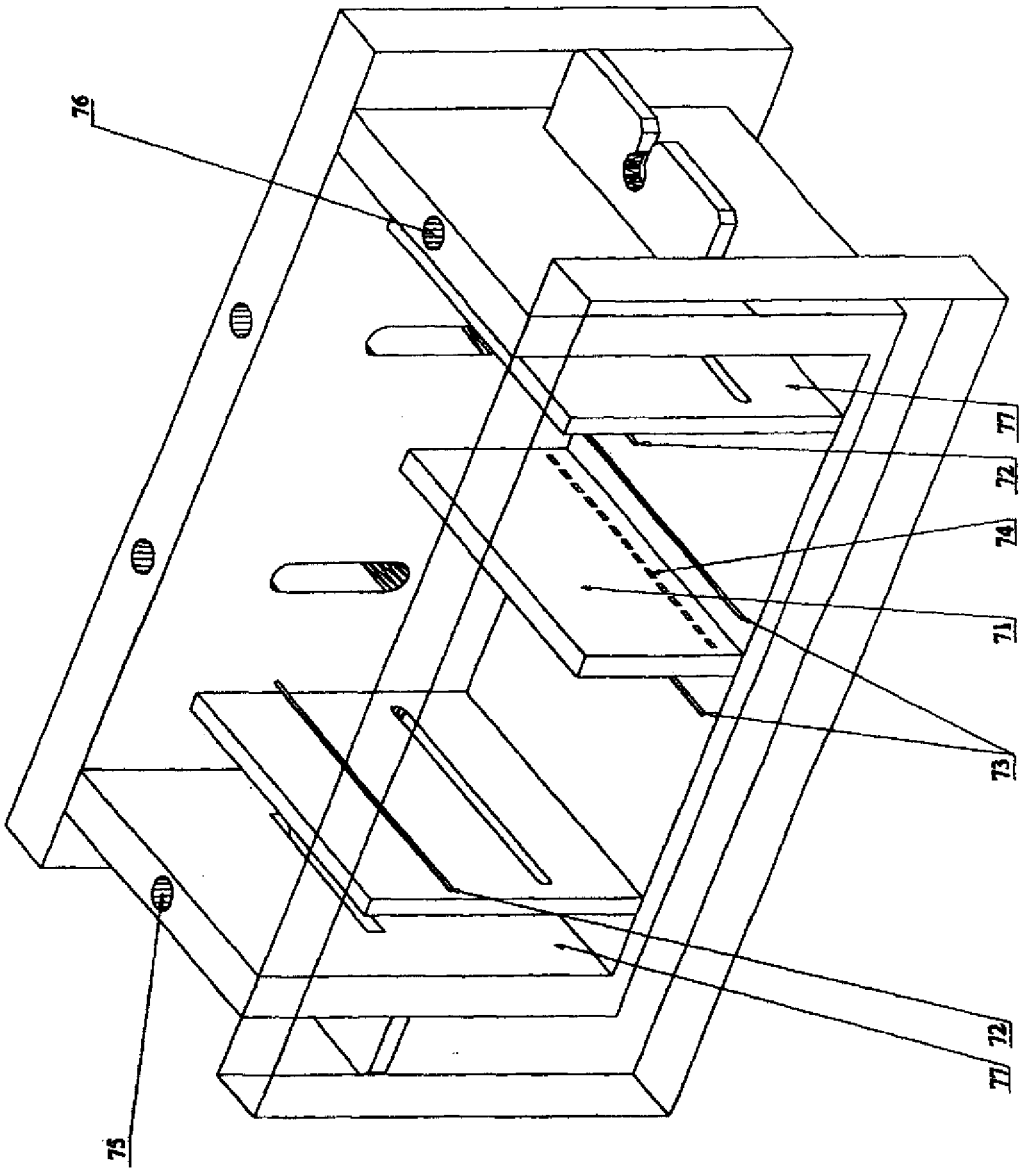


Figura 9

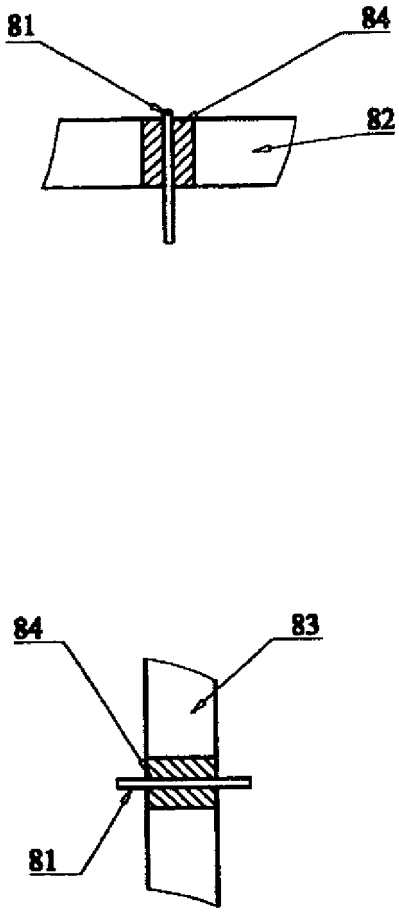


Figura 10

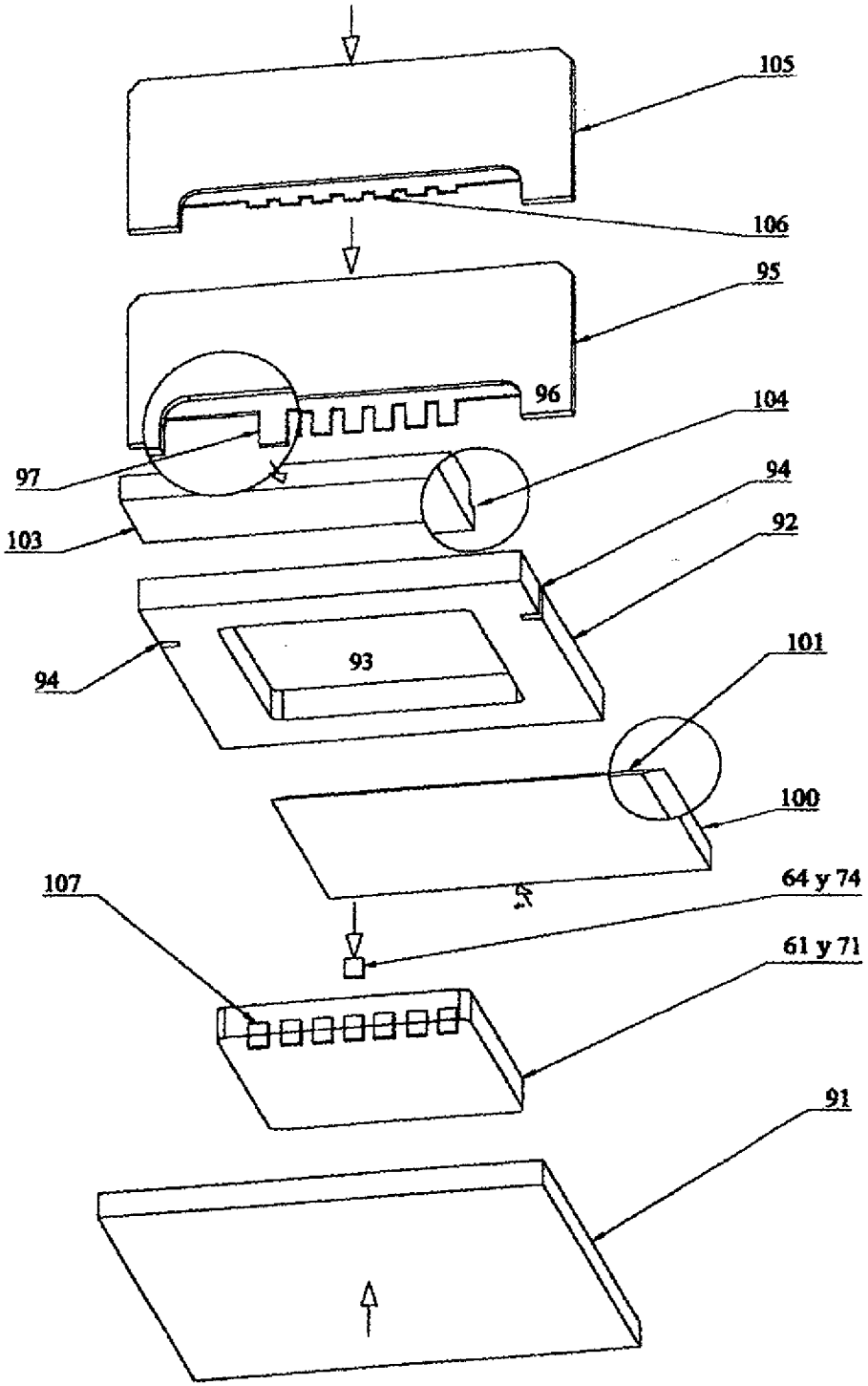


Figura 11

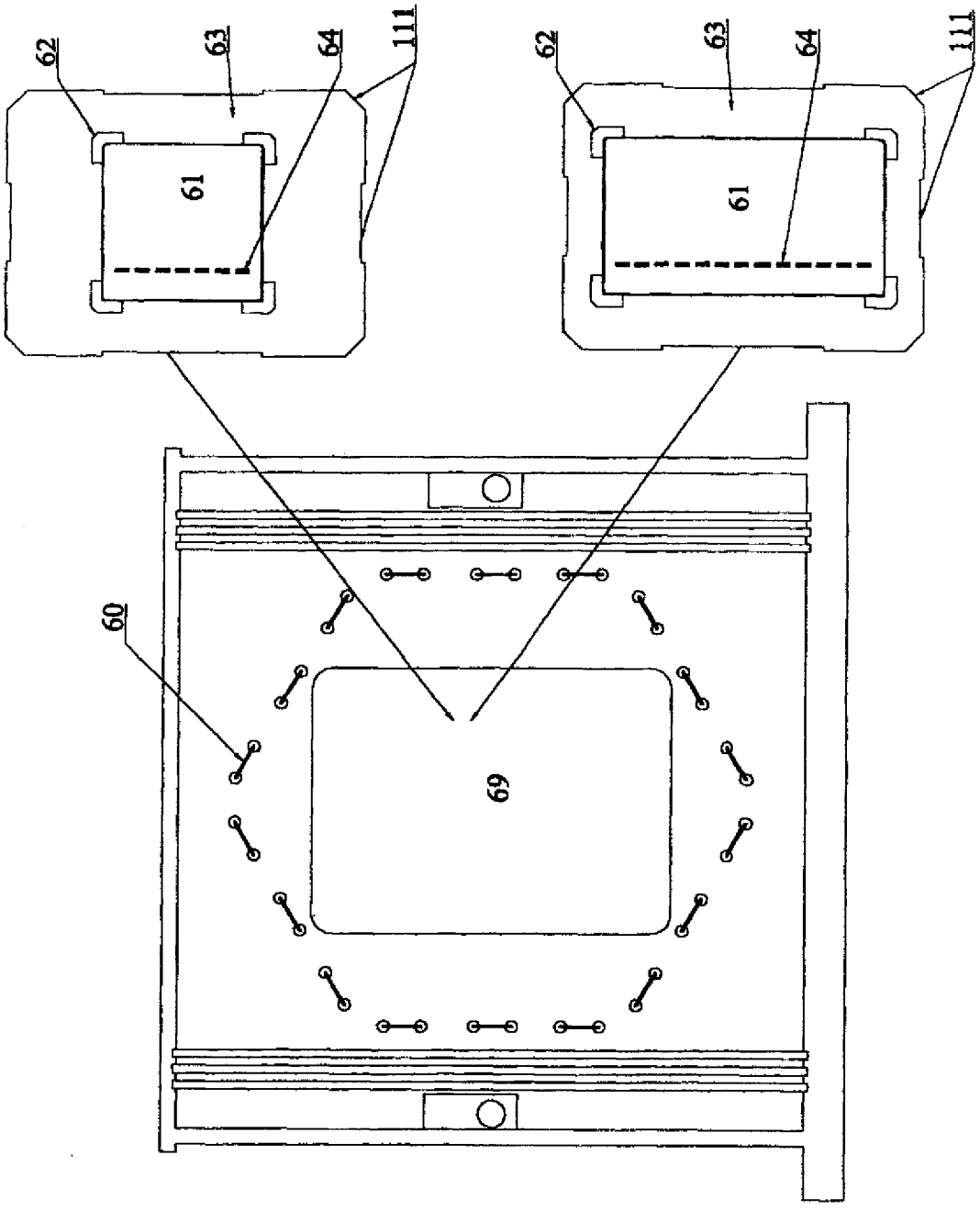


Figura 12

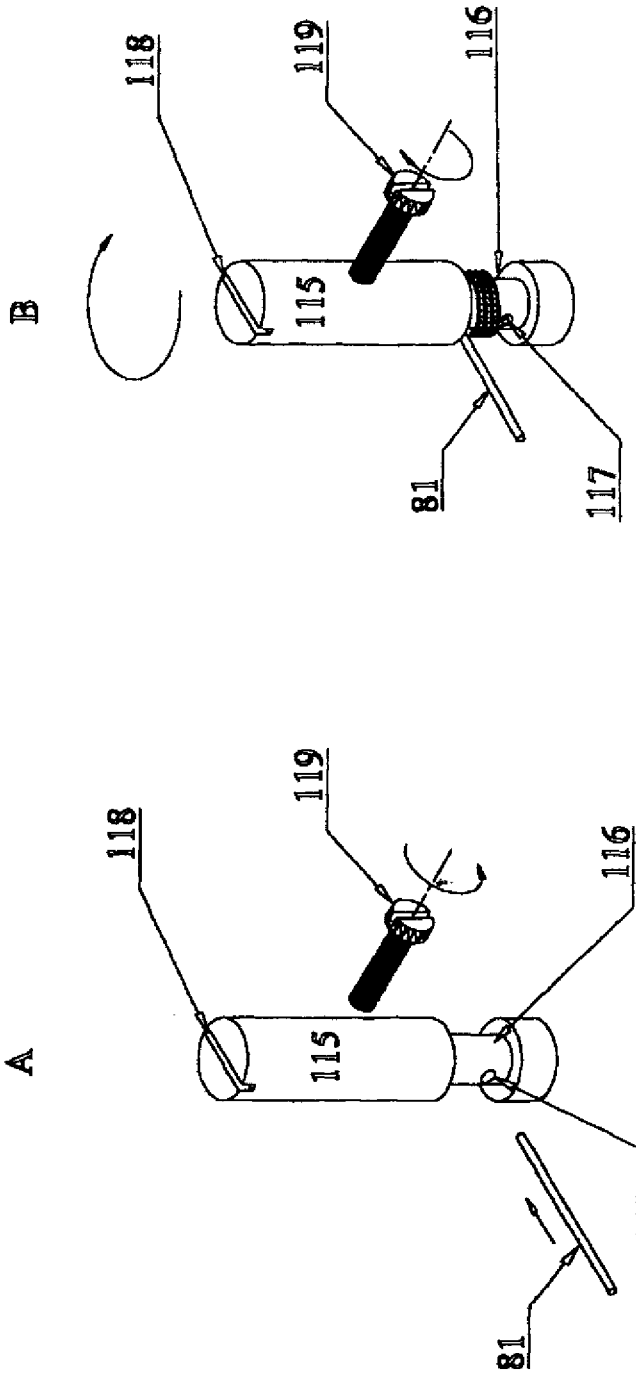


Figura 13

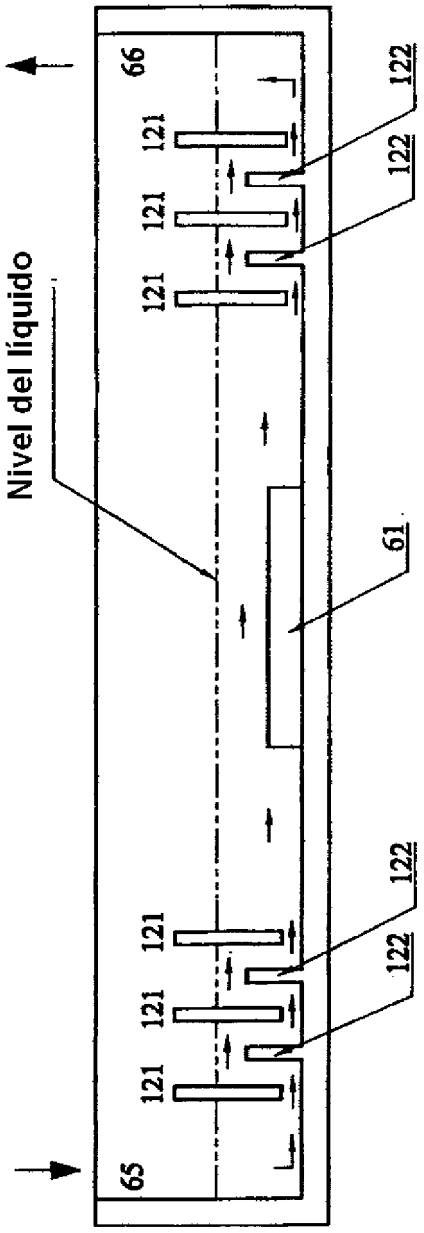


Figura 14

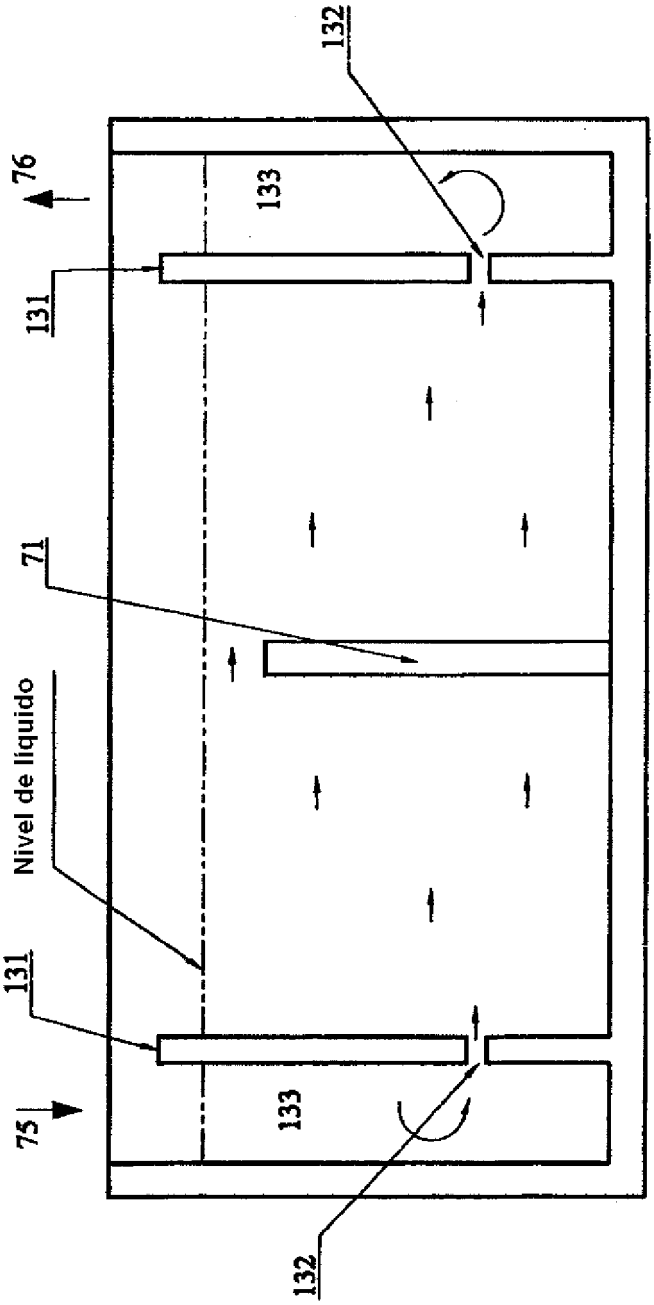


Figura 15

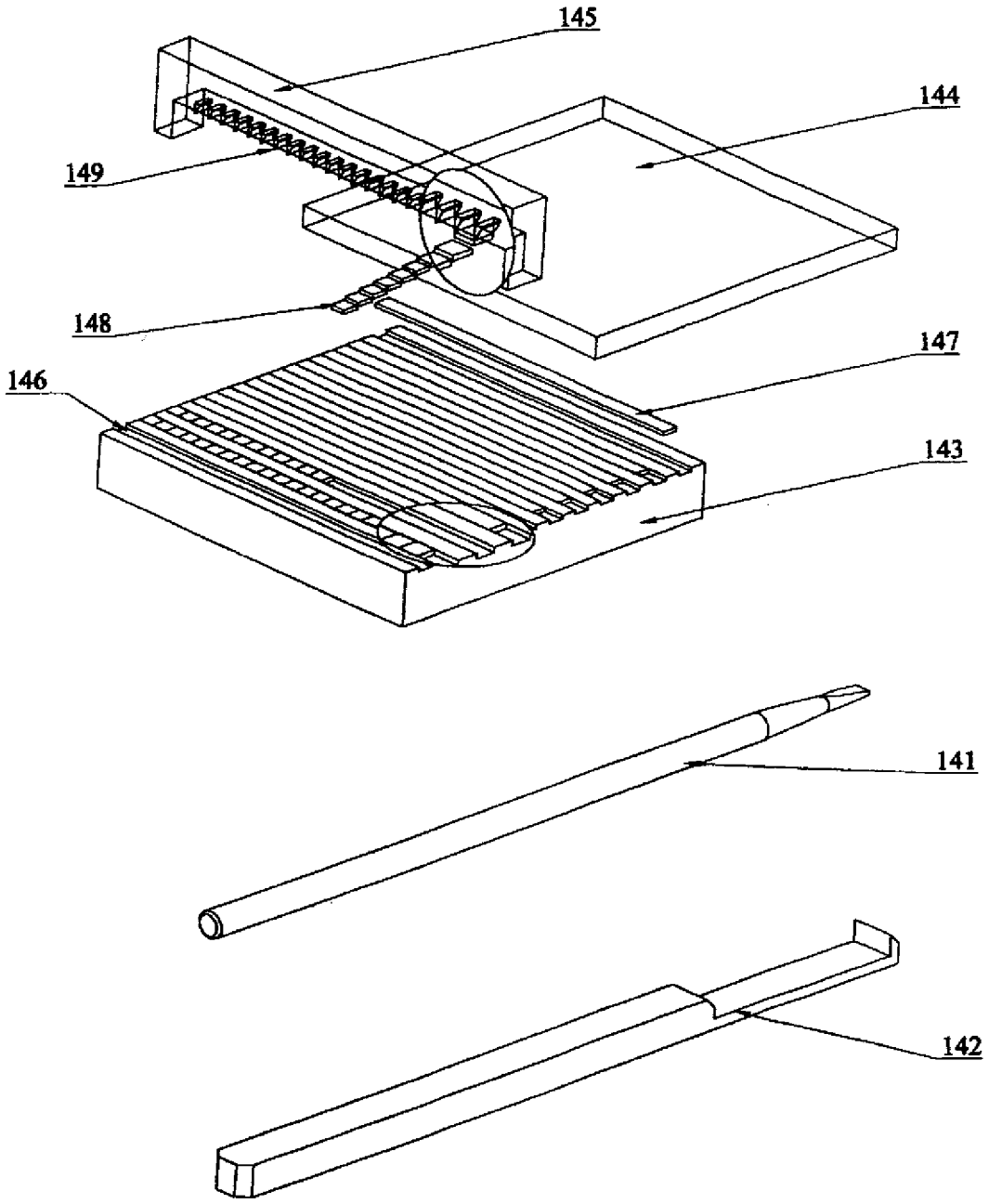


Figura 16

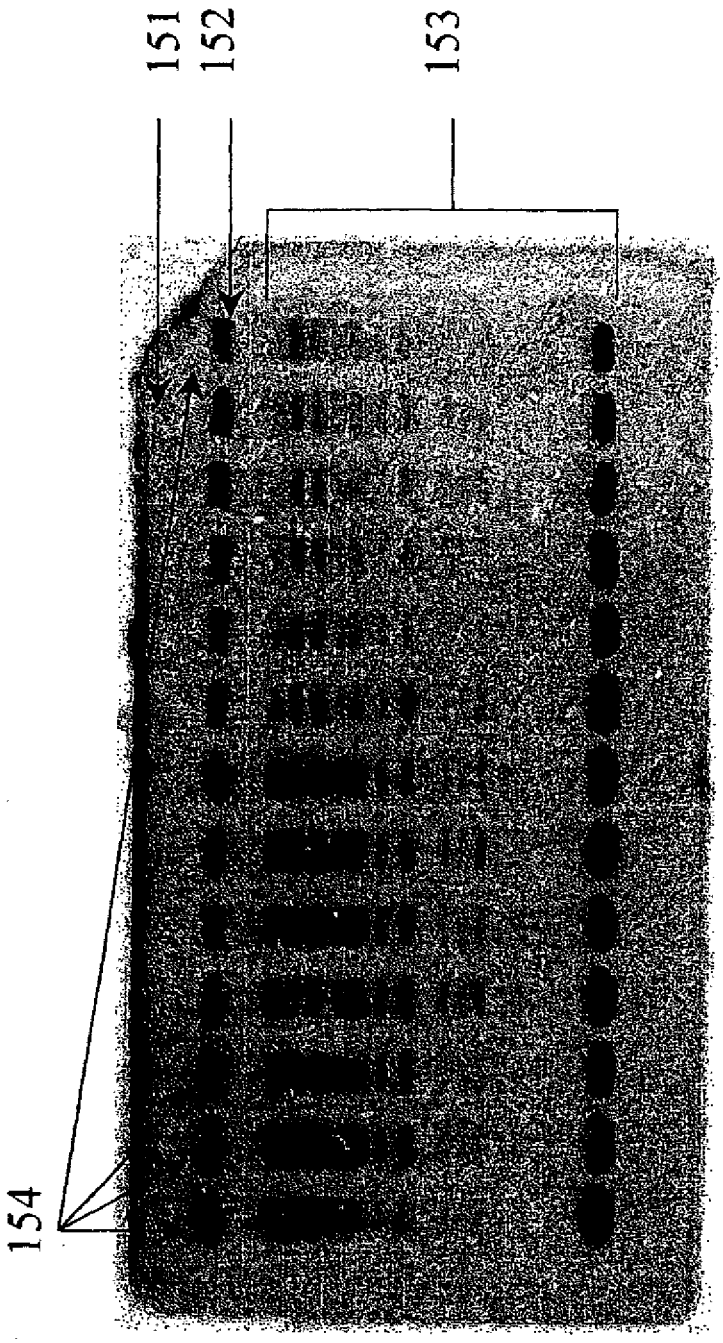


Figura 17

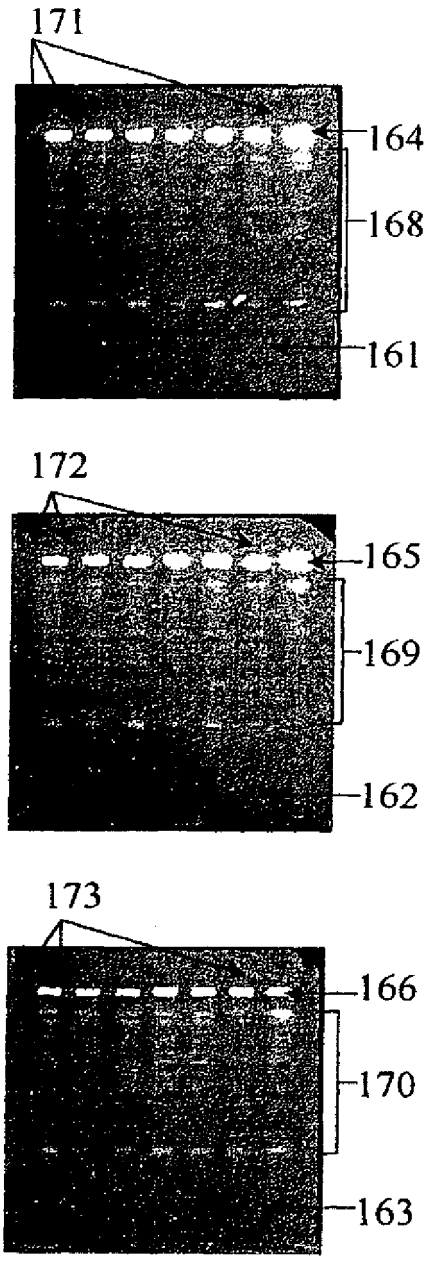


Figura 18