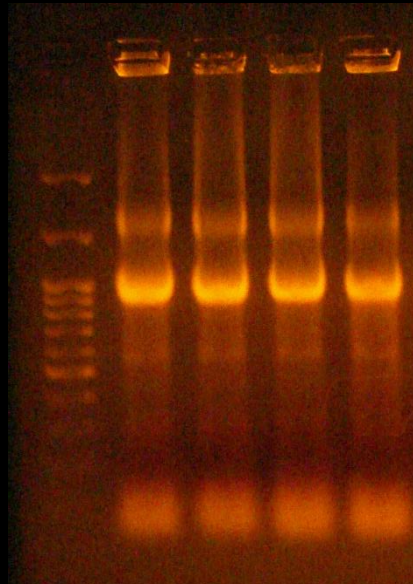
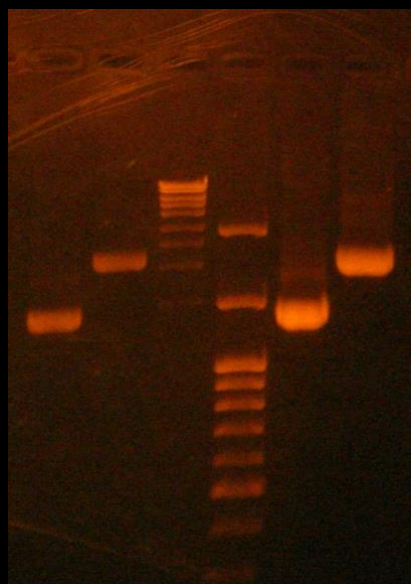


Εργαστηριακές ασκήσεις ΜΒ

Άσκηση 6

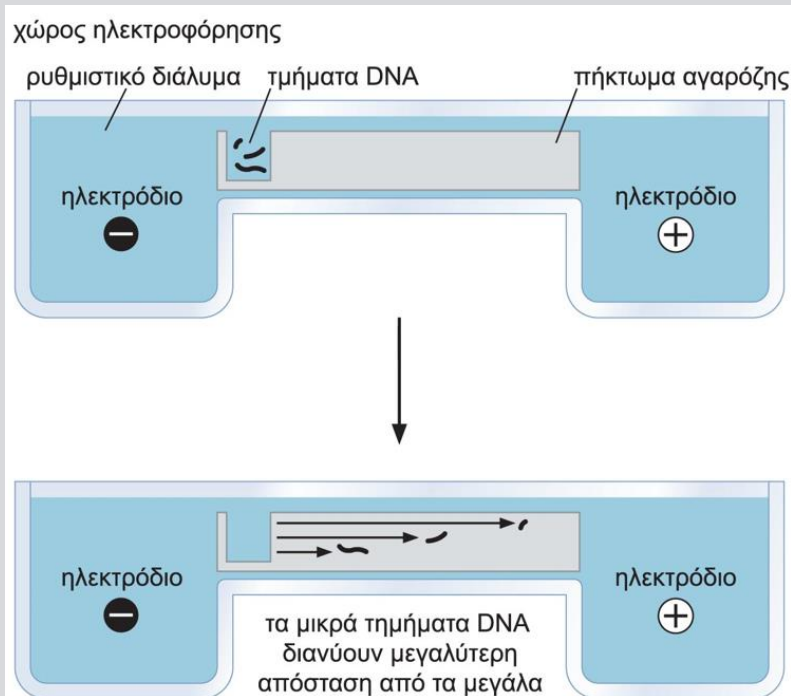
Ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης



Θεωρία

Με την ηλεκτροφόρηση μορίων DNA και RNA μπορούμε να:

- Διαχωρίσουμε τα μακρομόρια
- Προσδιορίσουμε το MB τους
- Ελέγχουμε την καθαρότητα και την ποιότητα
- Ποσοτικοποιήσουμε
- Χαρτογραφήσουμε τμήματα DNA για περιοριστικές ενδονουκλεάσες

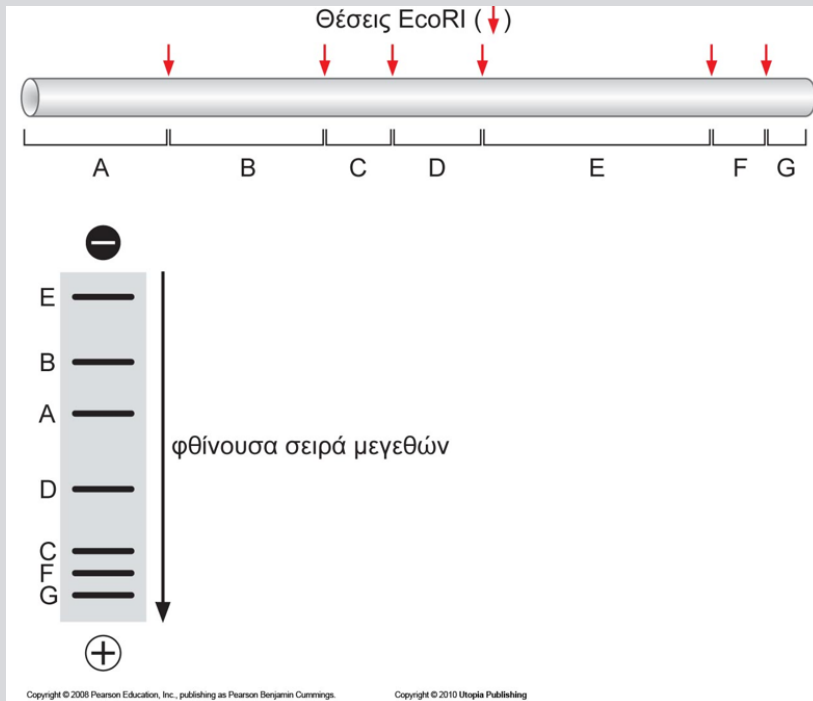


Αρχή της μεθόδου:

Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA και RNA αν βρεθούν υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μέσα σε υδατικό διάλυμα, θα κινηθούν προς το θετικό πόλο. Αν η ηλεκτροφόρηση γίνει μέσω ενός πηκτώματος (ενός αδρανούς πορώδους υλικού, όπως η **αγαρόζη**) που λειτουργεί σαν ηθμός, τα μόρια θα διαχωριστούν σύμφωνα με το μέγεθός τους (ή τη στερεοδιάταξή τους).

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων εξαρτάται από:

- Το μέγεθός τους (για γραμμικά μόρια)
- Τη συγκέντρωση του πηκτώματος
- Τη στερεοδιάταξη τους (για κυκλικά μόρια)
- Την ένταση του ρεύματος



➤ **Μέγεθος:**

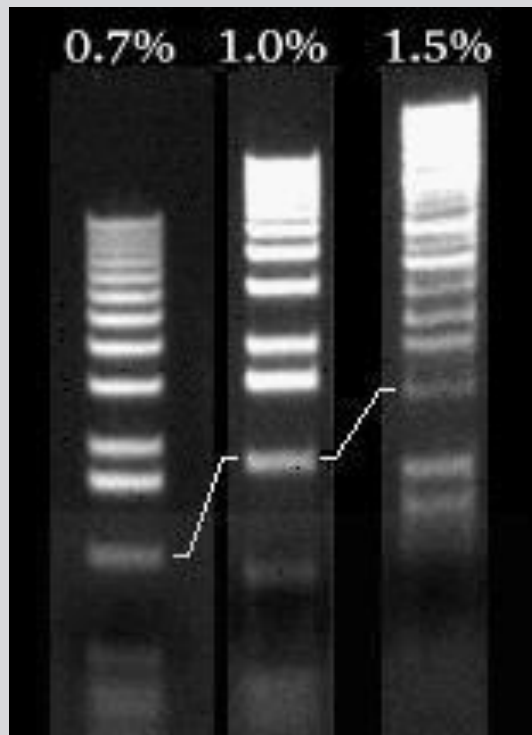
Γραμμικά δίκλινα μόρια DNA κινούνται στο πήκτωμα με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου (\log_{10}) του Μοριακού τους Βάρους

➤ **Συγκέντρωση αγαρόζης:**

Η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης.

Ως μέσο το πήκτωμα αγαρόζης έχει χαμηλή διακριτική ικανότητα (>20 bp), αλλά διαχωρίζει μεγάλο εύρος μεγεθών (λίγα bp έως εκατοντάδες Kb)

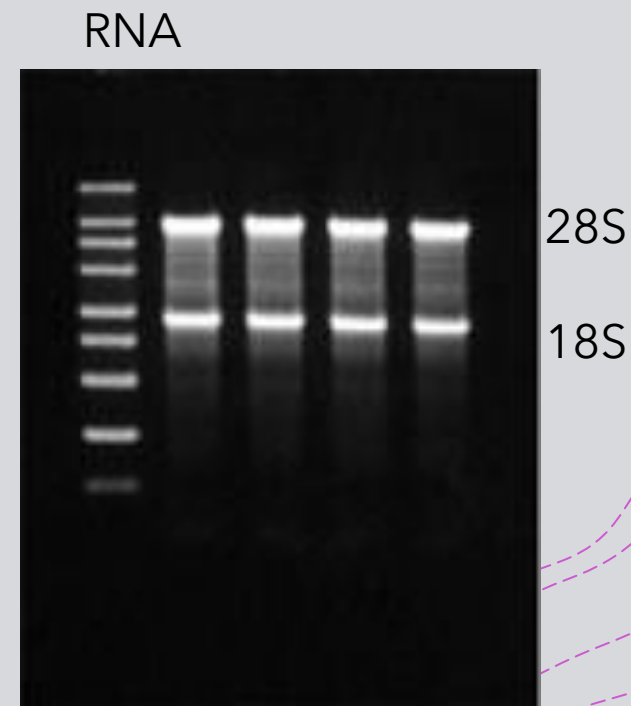
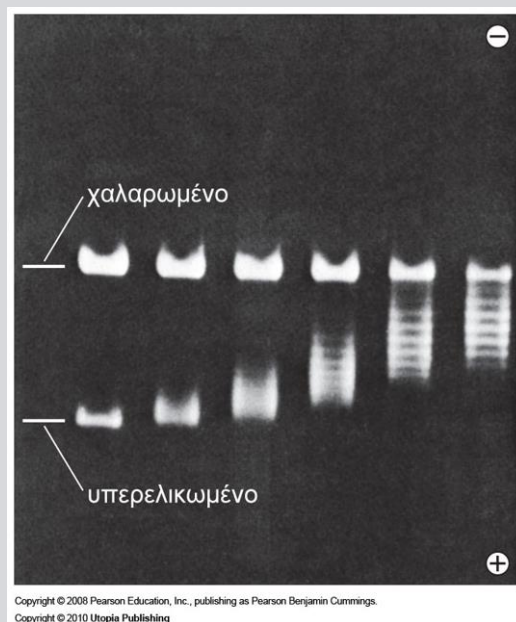
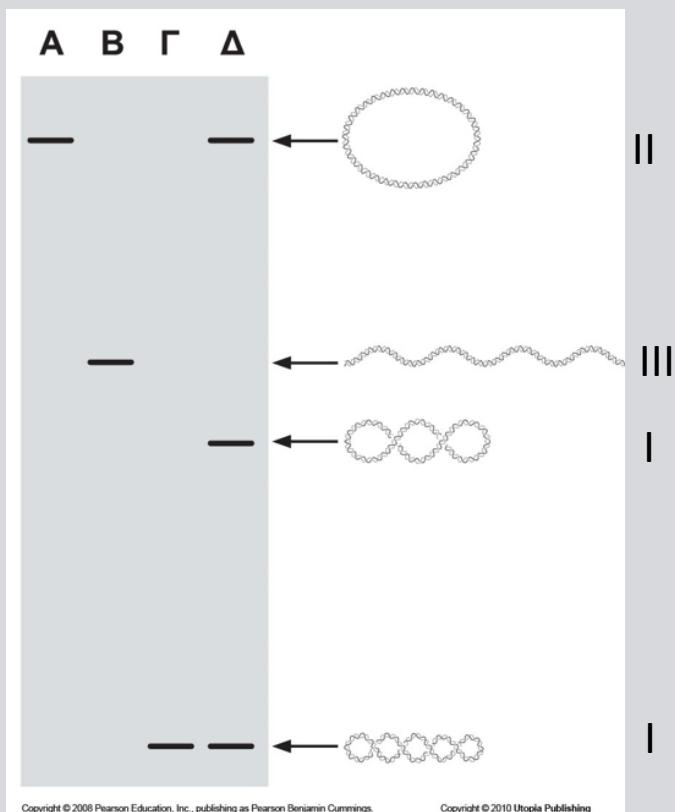
Χρησιμοποιώντας πήκτωμα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.



<u>% αγαρόζης στο πήκτωμα</u>	<u>Καλός διαχωρισμός γραμμικών DNA (kb)</u>
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.8	7-0.5
0.9	6-0.4
1.2	4-0.2
2.0	3-0.1

➤ Στερεοδιάταξη του DNA.

Τα κυκλικά μόρια DNA υφίσταται συνήθως σε 3 μορφές: **κλειστή κυκλική υπερελικωμένη** (μορφή I), η **ανοιχτή κυκλική** (μορφή II) και **γραμμική** (μορφή III). Παρόλο που και οι τρεις έχουν το ίδιο μοριακό βάρος η κινητικότητά τους διαφέρει. Οι σχετικές ταχύτητες των τριών μορφών εξαρτώνται από τη ισχύ του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού ρεύματος, την ιονική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I (κυκλική) του DNA.



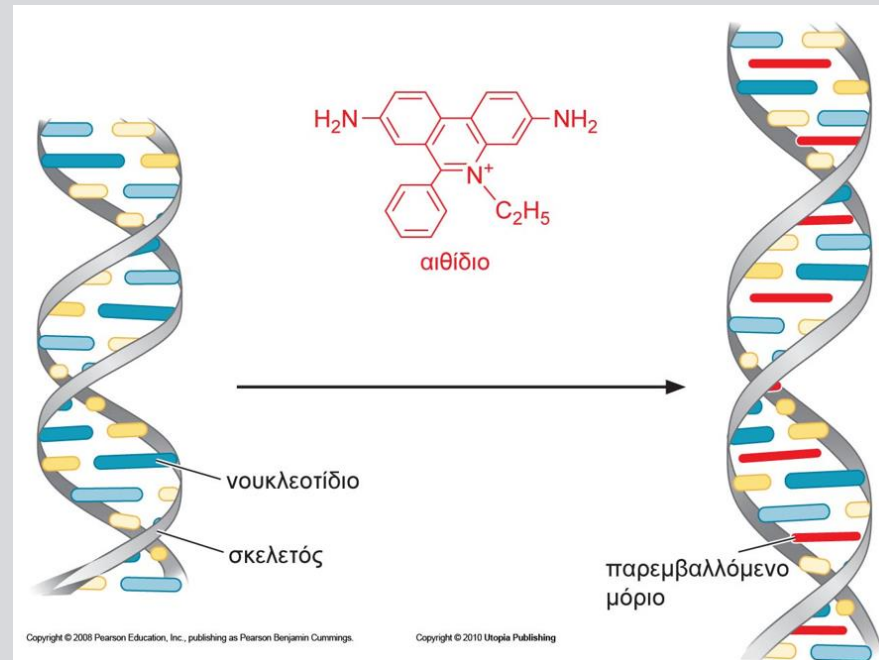
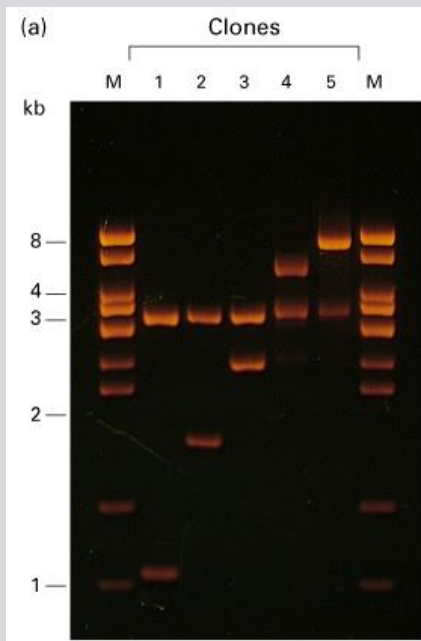
➤ Ένταση του ρεύματος

Σε χαμηλή τάση (5v/cm) η κινητικότητα γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογη προς το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Αν αυξήσουμε την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου, η κινητικότητα των μεγάλων κομματιών του DNA αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή για κάθε τμήμα DNA. Για το λόγο αυτό, μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αгарόζης καθώς αυξάνονται τα volts που χρησιμοποιούνται. Στην πράξη η διαφορά δυναμικού μπορεί να φτάσει μέχρι 10v/cm χωρίς σημαντική επίπτωση στη σχετική κινητικότητα των κομματιών DNA.

Οπτικοποίηση μορίων

Τα μόρια DNA γίνονται ορατά με χρώση με φθορίζουσες χρωστικές όπως Βρωμιούχο αιθίδιο, Sybr green, Gel Red κ.α

Το αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και έχει την ιδιότητα να απορροφάει στο υπεριώδες μήκος κύματος (UV) και να φθορίζει στο ορατό δίνοντας μία πορτοκαλί χροιά. Τα μόρια του DNA εμφανίζονται ως ζώνες και κάθε ζώνη αντιστοιχεί σε ένα πληθυσμό μορίων ίδιου μεγέθους.



Η παρεμβολή του αιθιδίου στις βάσεις του DNA κάνει το μόριο πιο άκαμπτο και μειώνει την κινητικότητα του λόγω της εξουδετέρωσης των φορτίων. Στα κυκλικά μόρια μειώνει και τις υπερελικώσεις.

Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer)

Για την τοποθέτηση των δειγμάτων DNA στο πήκτωμα προστίθεται σε αυτά δ/μα φόρτωσης που περιέχει:

- Χρωστικές (0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης και/ή 0.025% κυανού της ξυλόλης) οι οποίες είναι αδρανείς και μετακινούνται παράλληλα με τις ζώνες του DNA με ταχύτητα αντίστοιχη τμημάτων DNA συγκεκριμένου μεγέθους (ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης).
- Γλυκερόλη (5-10%) η οποία να κάνει το δείγμα πιο ιξώδες ώστε να παραμείνει στον πάτο της θέσης φόρτωσης στο πήκτωμα (πηγαδάκι).

Συνήθης συγκέντρωση stock διαλύματος: **6X**

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν Tris-Βορικό οξύ-EDTA ή Tris-οξικό οξύ-EDTA ή Tris-φωσφορικό οξύ-EDTA. Παρέχουν την ανάλογη ιονική ισχύ που χρειάζεται για να γίνει ηλεκτροφόρηση.

Συνήθως τα παρασκευάζουμε σε πενταπλάσια (5X) ή δεκαπλάσια (10X) συγκέντρωση και διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην άσκηση θα χρησιμοποιηθεί TBE (100 mM Tris, 85 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA).

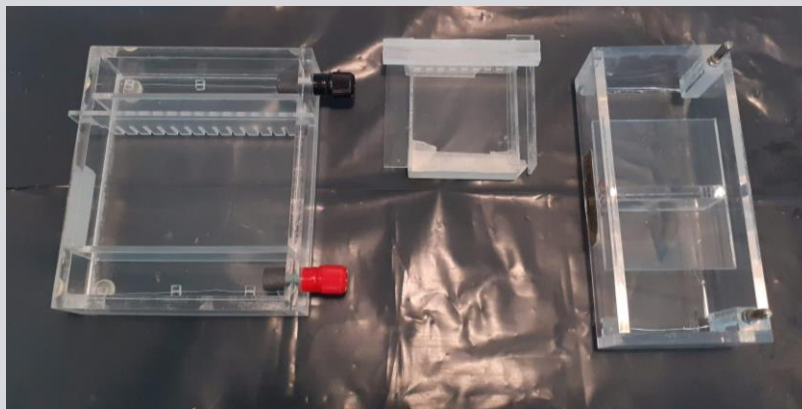
Marker

Μείγμα γραμμικών μορίων DNA γνωστού μοριακού βάρους. Ηλεκτροφορεύεται παράλληλα με τα δείγματα για τον προσδιορισμό του μεγέθους ζωνών που αντιστοιχούν σε γραμμικά μόρια.

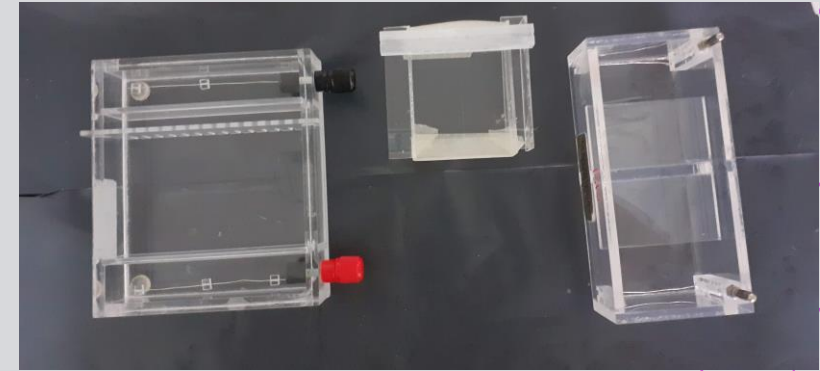
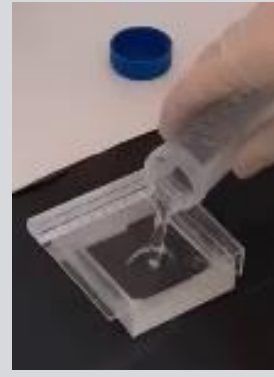
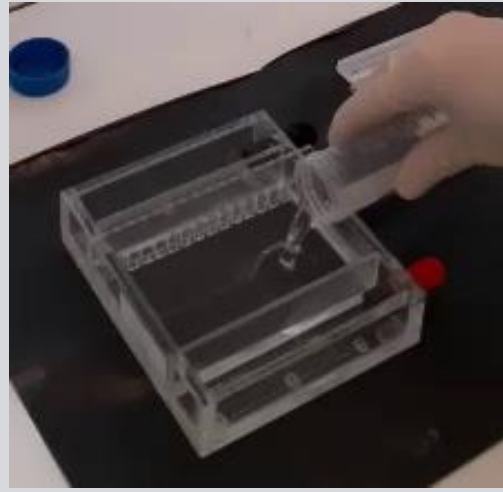
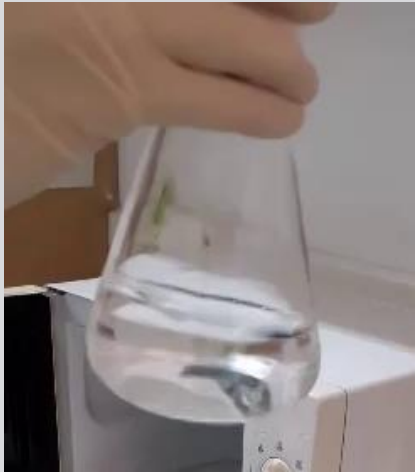
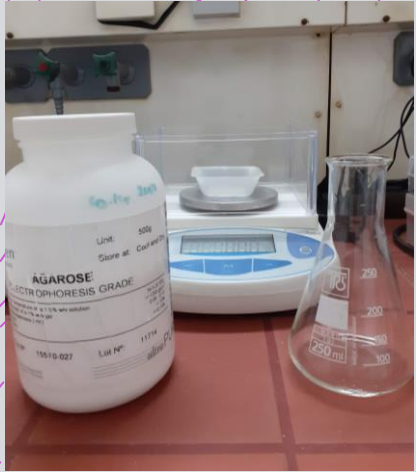
Πειραματική διαδικασία

Παρασκευή πηκτώματος

- Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε 1 g σκόνης αγαρόζης και 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος.
- Θερμαίνουμε ανακινώντας έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη (χρειάζεται να βράσει).
- Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/ml}$.
ΠΡΟΣΟΧΗ: Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το δέρμα μας.
- Συναρμολογούμε την συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούμε κάθετα στην κατάλληλη θέση τη “χτένα” που θα δημιουργήσει θήκες για τη φόρτωση του δείγματος όταν πήξει η αγαρόζη.
- Ρίχνουμε προσεκτικά το ζεστό διάλυμα της αγαρόζης στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.

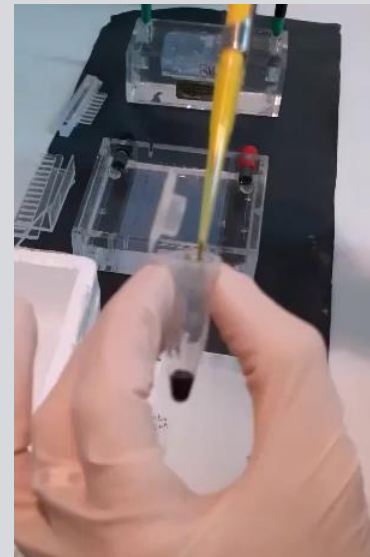
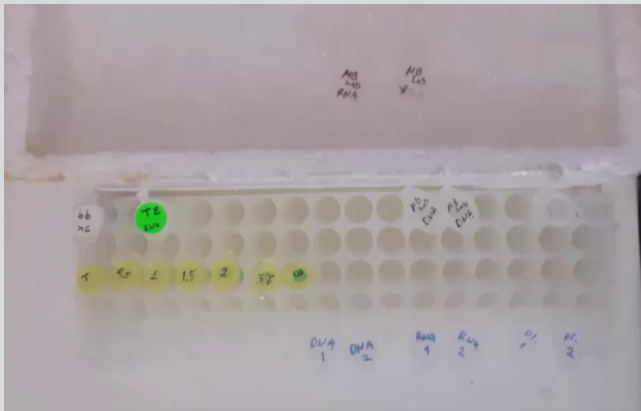


Παρασκευή πηκτώματος

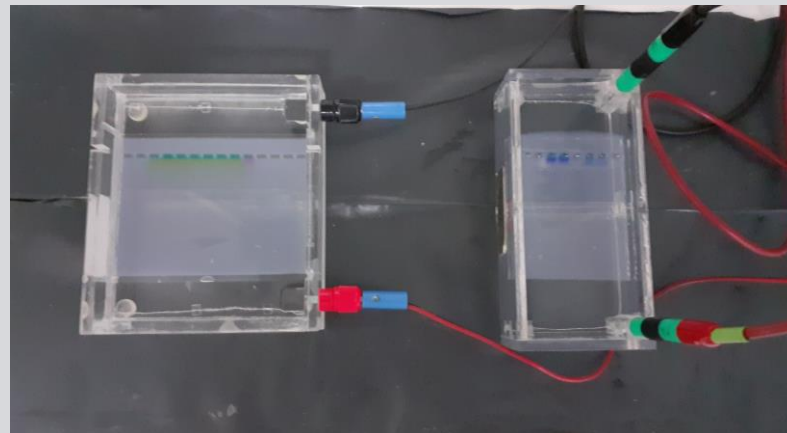
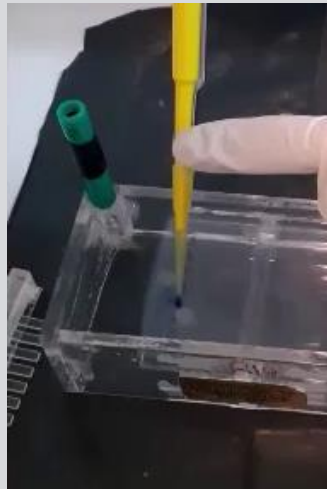
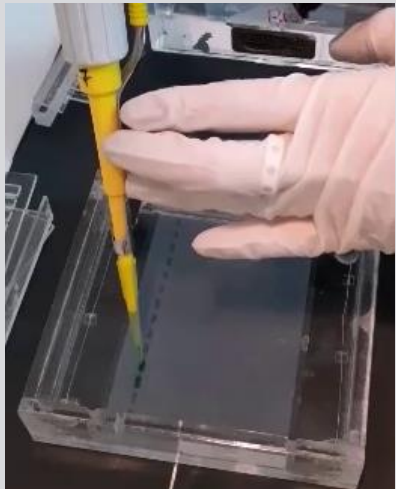
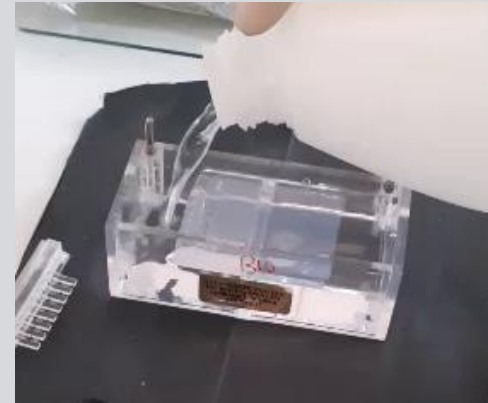
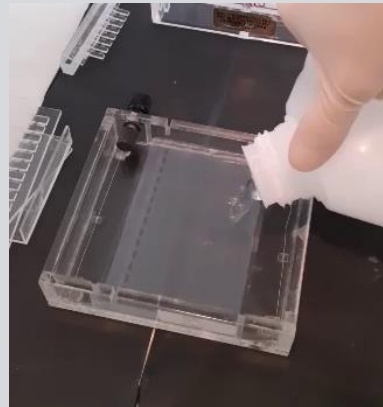
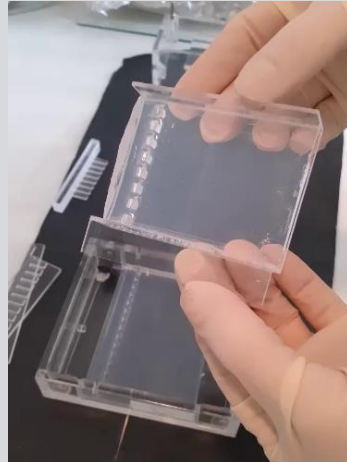
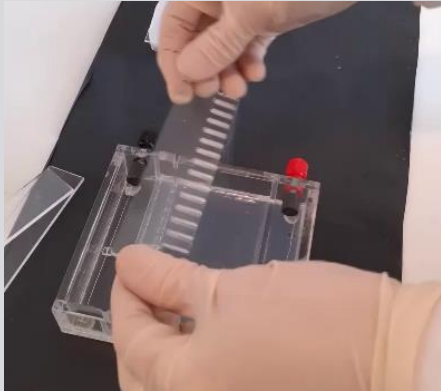


Προετοιμασία δειγμάτων

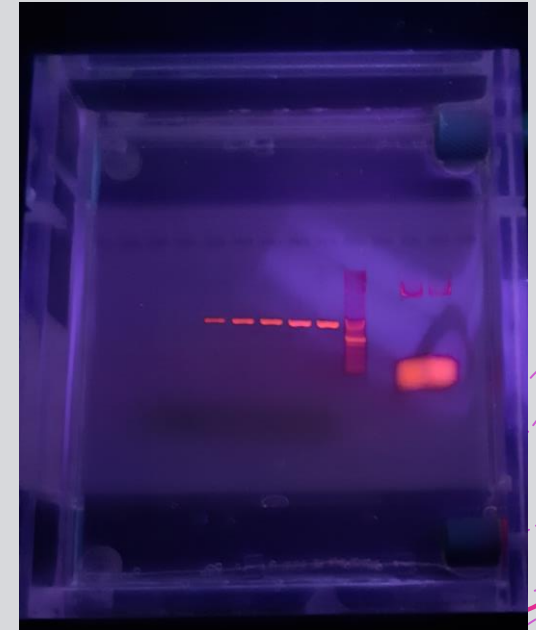
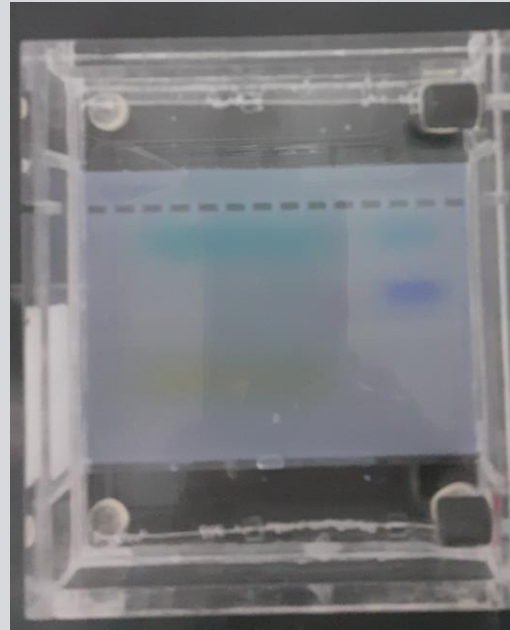
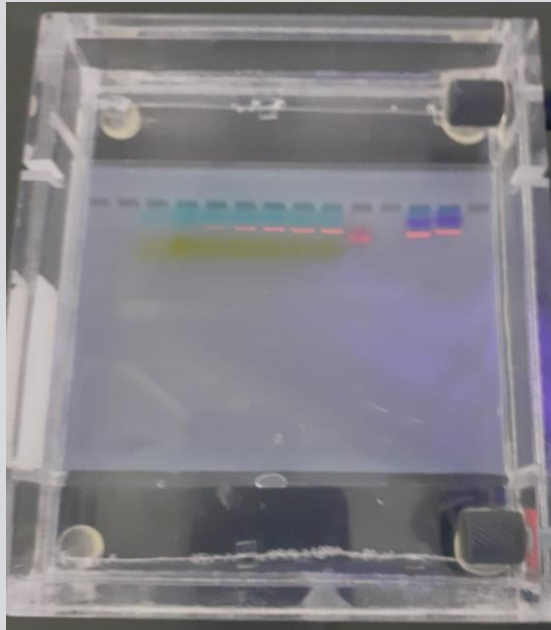
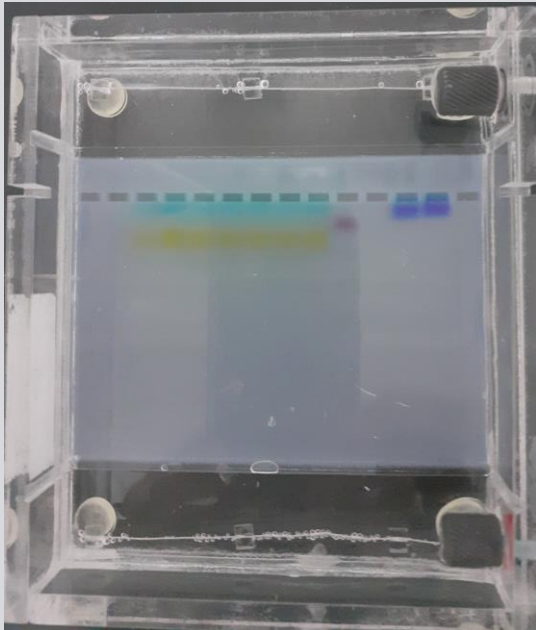
Δείγμα	V (sample)	V (TE)	Loading buffer 6X
DNA	10 μ l	-	2 μ l
RNA	5 μ l	5 μ l	2 μ l
Plasmid DNA	5 μ l	5 μ l	2 μ l
PCR	10 μ l	-	-



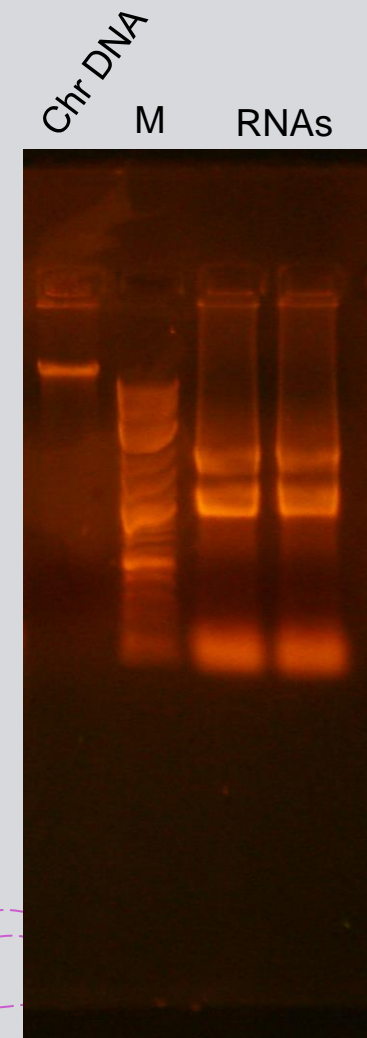
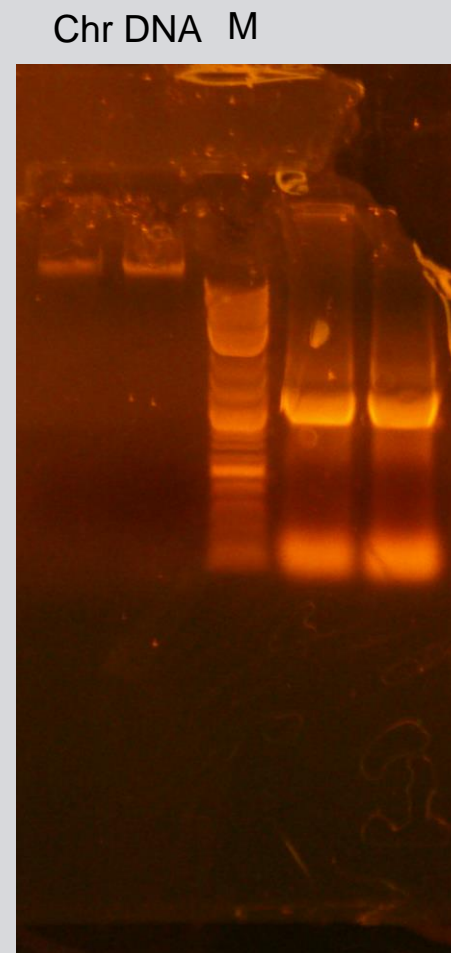
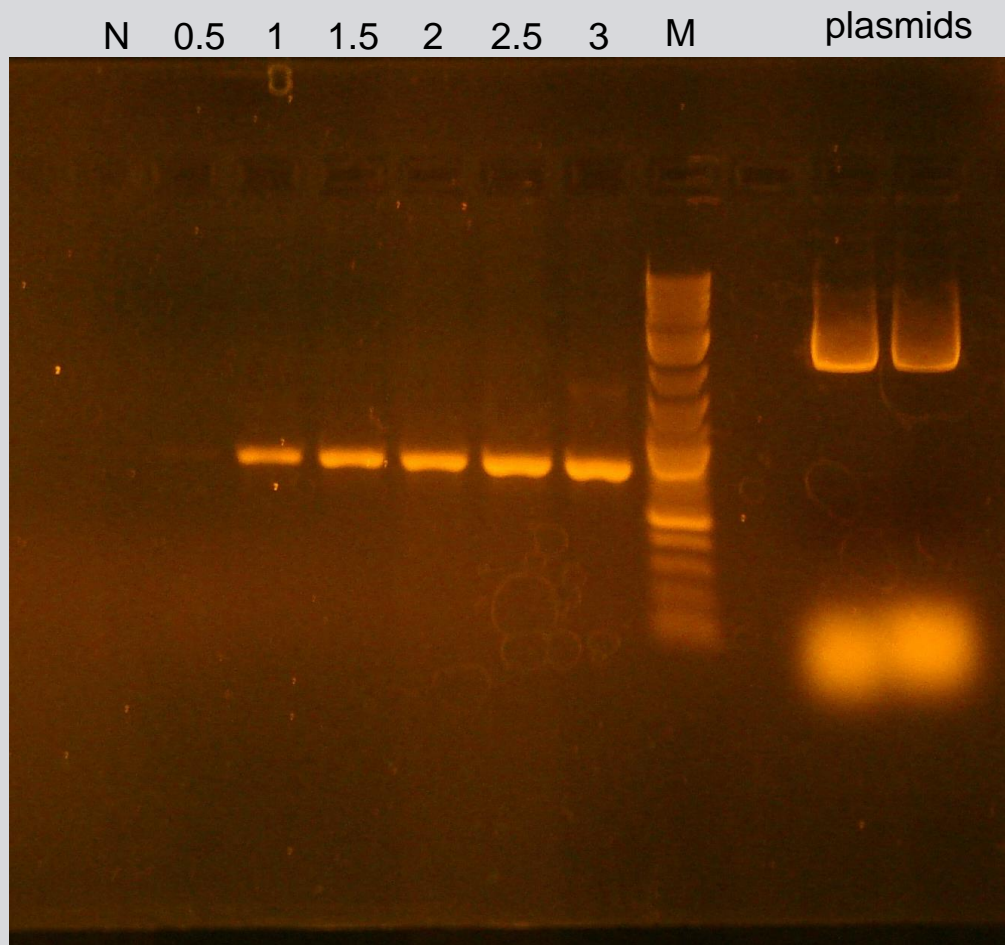
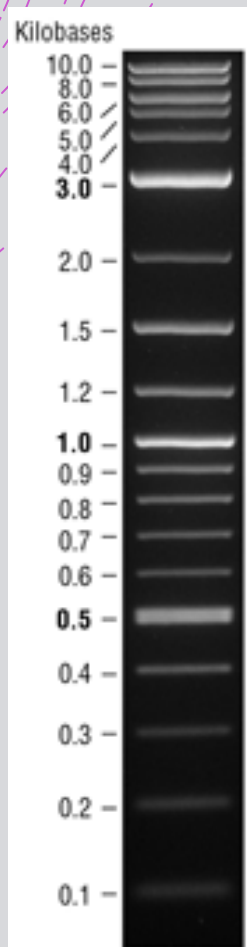
- Όταν πήξει εντελώς η αγαρόζη, αφαιρούμε προσεκτικά τη χτένα και βυθίζουμε το πήκτωμα στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα.
- Τοποθετούμε (φορτώνουμε) τα δείγματα στα πηγαδάκια (gel loading) και ξεκινάμε την ηλεκτροφόρηση.



- ▶ Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης μπορούμε να παρακολουθούμε τον διαχωρισμό των ζωνών του DNA με λάμπα υπεριώδους φωτός (πρέπει να φοράμε ειδικά ή κοινά απορροφητικά γυαλιά στα μάτια).
- ▶ Χρησιμοποιώντας υπεριώδες φως μπορούμε να φωτογραφήσουμε το πήκτωμα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης.



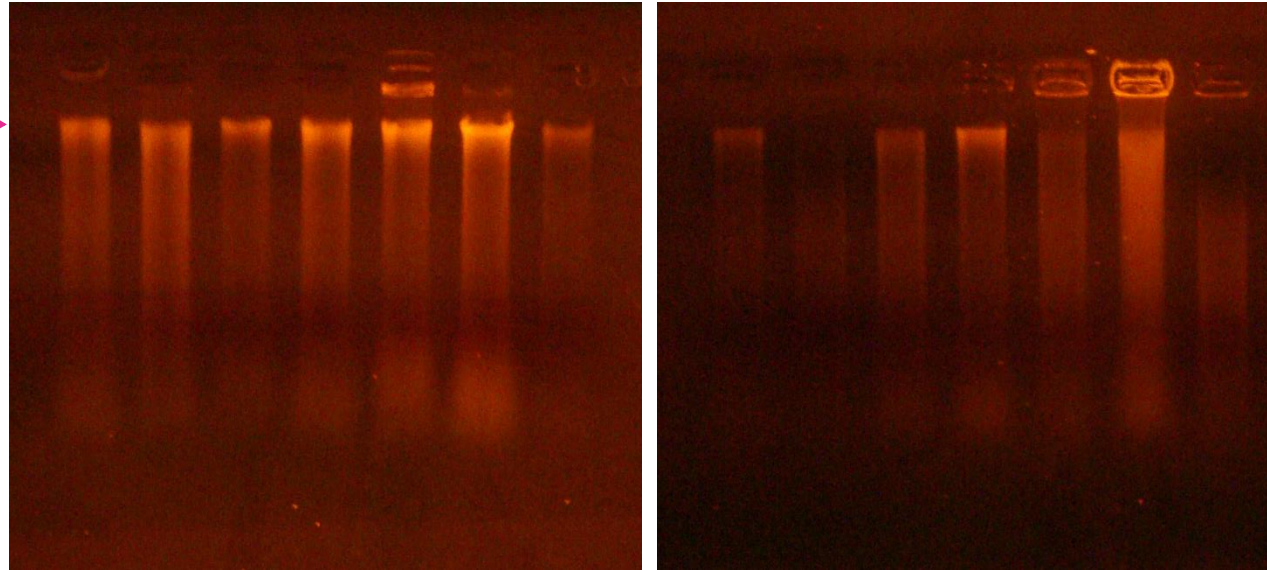
Φωτογράφιση - αποτελέσματα



2019

Χρωμοσωμικό DNA →

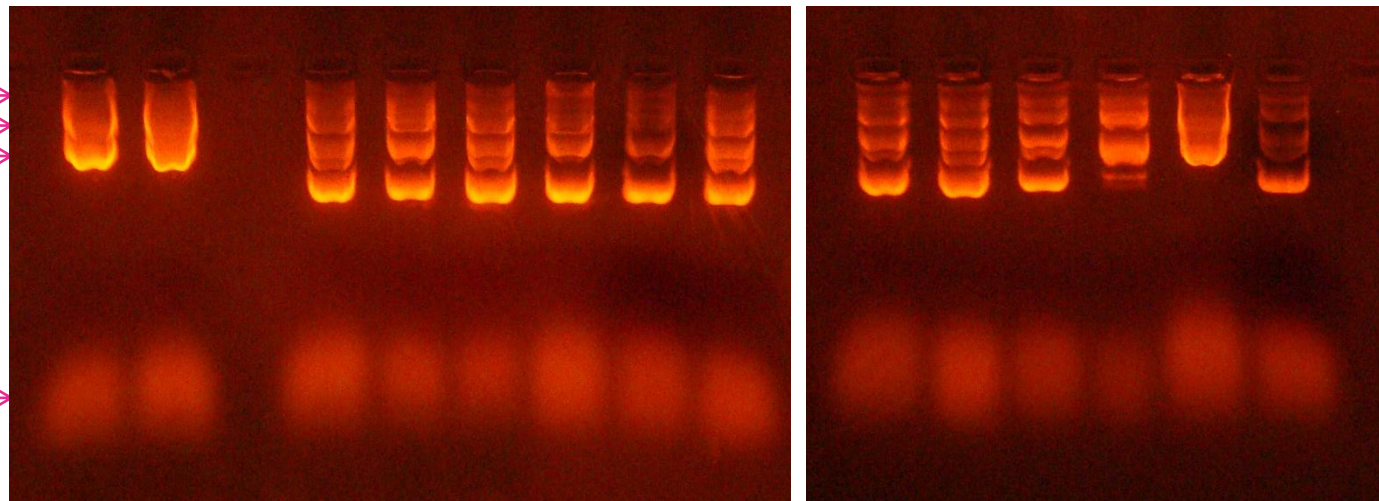
Σπασμένα ή
αποδιαταγμένα
μόρια DNA



Πλασμιδιακό DNA

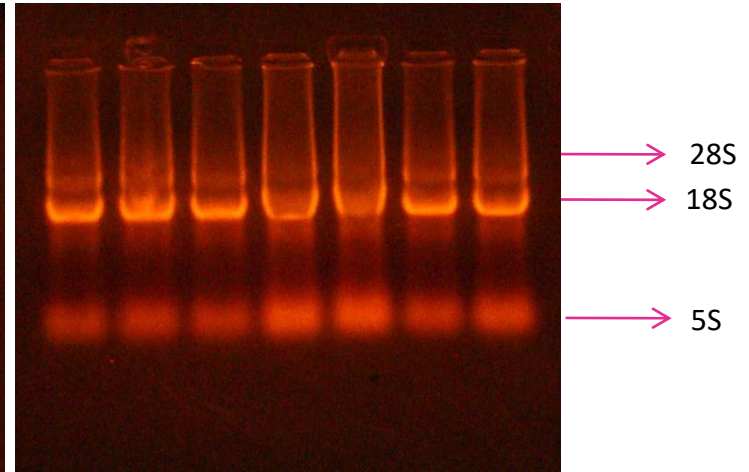
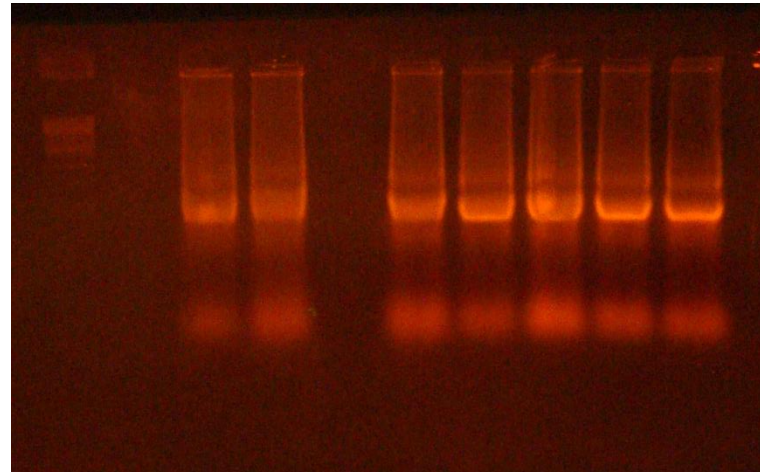
Μορφές
κυκλικών
μορίων
πλασμιδικού
DNA*

Βακτηριακό
RNA →

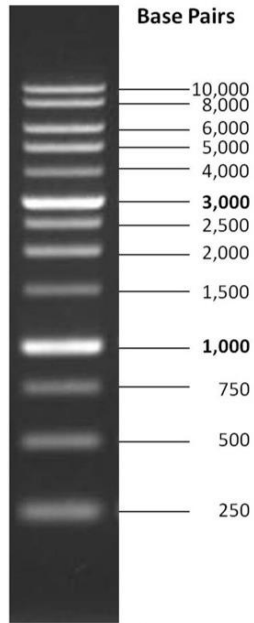


2019

RNA

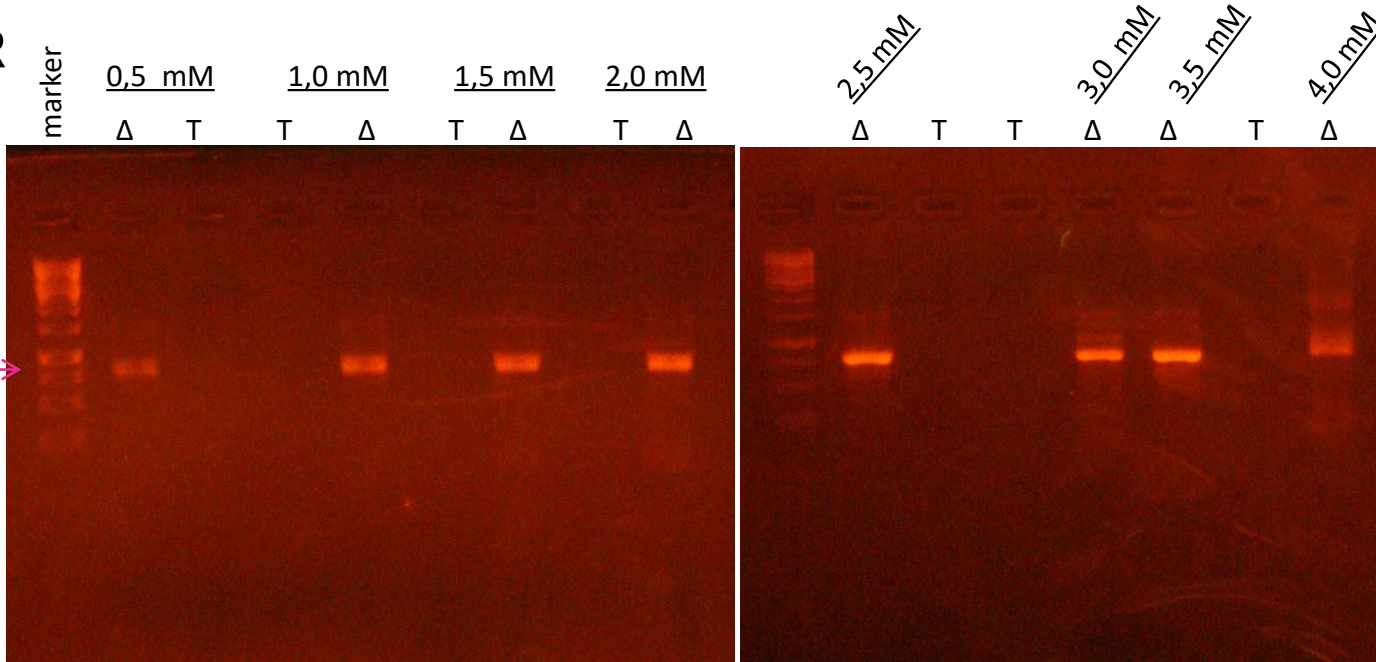


marker



TAE Agarose Gel

PCR



Προϊόν
800 bp

Δ : δείγμα
T : τυφλό