Primjena elektroforetskih tehnika u analizi nukleinskih kiselina

Dončević, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:109636

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Preddiplomski studij kemije

Lucija Dončević

Primjena elektroforetskih tehnika u analizi nukleinskih kiselina

Završni rad

Mentorica : doc.dr.sc. Katarina Mišković Špoljarić

Osijek, 2017.

Sažetak

U ovom radu opisana je primjena elektroforetskih tehnika u svrhu ispitivanja nukleinskih kiselina. Opisane su značajke i struktura nukleinskih kiselina i značaj različitih postupaka elektroforeze. Provedena je elektroforeza u agaroznom gelu pri čemu su ispitivani humani uzorci DNA, RNA i PCR produkti. Svrha provedenog eksperimenta bio je uvid u cjelokupni postupak elektroforeze u agaroznom gelu.

Ključne riječi:

DNA i RNA, elektroforetske tehnike, elektroforeza u agaroznom gelu, analiza nukleinskih kiselina

Abstract

This work examines the application of electrophoretic techniques for the purpose of researching nucleic acids. The features and the structure of nucleic acids are theoretically described, and the importance of each of the electrophoretic procedures is included. The procedure of electrophoresis in agarose gel was implemented with human samples of DNA, RNA and PCR products. Purpose of this experiment was insight into the overall procedure of electrophoresis in agarose gel.

Keywords:

DNA and RNA, electrophoretic techniques, elestrophoresis in agarose gel, analysis of nucleic adids

Sadržaj:

1. UVOD **1**
2. NUKLEINSKE KISELINE **2**
2.1. DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISELINA- DNA **3**
2.2. RIBONUKLEINSKA KISELINA- RNA **5**
3. ELEKTROFORETSKE TEHNIKE ZA ANALIZU NUKLEINSKIH KISELINA **6**
3.1. VRSTE ELEKTROFORETSKIH TEHNIKA **7**
3.1.1. Slobodna elektroforeza 7
3.1.2. Zonska elektroforeza 7
3.1.3. Izoelektrično fokusiranje 8
3.1.4. Izotahoforeza 9
3.1.5. Dvosmjerna elektroforeza 9
3.1.6 Kapilarna elektroforeza 9
4. PRIMJENA ELEKTROFOREZE U AGAROZNOM GELU **10**
4.1. OPIS METODE **11**
5. EKSPERIMENTALNI RAD **13**
5.1. MATERIJALI **13**
5.1.1. Pribor i kemikalije 13
5.2. IZRADA AGAROZNOG GELA **14**
5.3. NANOŠENJE UZORKA **15**
5.4. ELEKTROFOREZA **16**
5.5. OBRADA DOBIVENIH REZULTATA **18**
6. RASPRAVA **19**
7. ZAKLJUČAK **20**
8. LITERATURA **21**

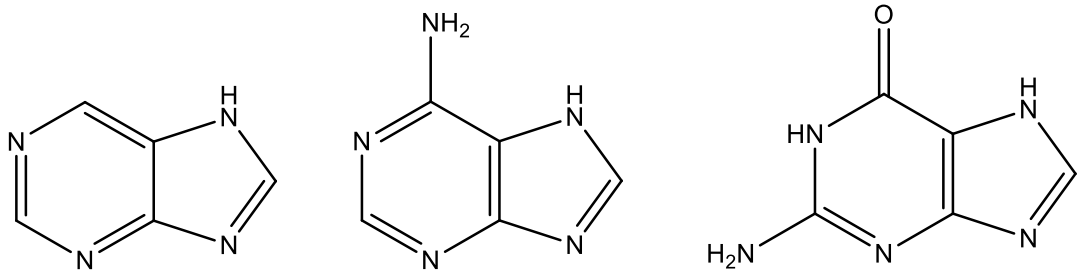
1. UVOD

Ljudski organizam obuhvaća veliki broj biokemijskih procesa koji se odvijaju svake sekunde u našem tijelu. Temelje se na interakciji dviju molekula koje zatim vrše specifičnu biološku funkciju. Stanične molekule mogu imati malu molekulsku masu i izgrađene su samo od atoma poput glukoze i laktoze, a mogu biti vrlo složene strukture i velikih molekulskih masa poput nukleinskih kiselina i proteina. Istraživanje životnih procesa omogućuje nam shvatiti principe, promijene i svrhu našega organizma te otkriva izvorišta bolesti i druge stanične modifikacije. Znanstvenici aktivno djeluju u području biokemije od 1828. godine kada je Friedricha Wohler otkrio da se biološke molekule poput uree mogu sintetizirati iz neživih komponenti. Razvoj analitičkih metoda tijekom povijesti omogućile su nam objasniti biološku raznolikost istraživanjem nukleinskih kiselina. Deoksiribonukleinska kiselina (DNK, eng. DNA), ključna je molekula u kojoj je uskladištena genetička informacija svih staničnih organizama, dok je ribonukleinska kiselina (RNK, eng. RNA), genetički materijal nekih virusa. Otkriće DNA i objašnjenje njene strukture 1953. godine razjasnilo je niz bioloških procesa. Razvoj brojnih instrumentalnih tehnika uvelike je omogućilo brz i praktičan pristup biokemijskih i analitičkih analiza. Istraživanje gena i genoma u grani biokemije najčešće se zasniva na otkrivanju kako ono utječe na ljudsko zdravlje i bolesti. DNA se istražuje tako da se fragmentira pomoću restrikcijskih enzima te se ti fragmenti vizualiziraju elektroforezom u gelu. Nadalje, rekombinacijom DNA mogu se molekularno kontrolirati ubačeni fragmenti DNA, dok se PCR tehnika primjenjuje za umnožavanje određene sekvence DNA. U ovome će radu biti objašnjena i prikazana primjena elektroforeze u analizi nukleinskih kiselina. [1]

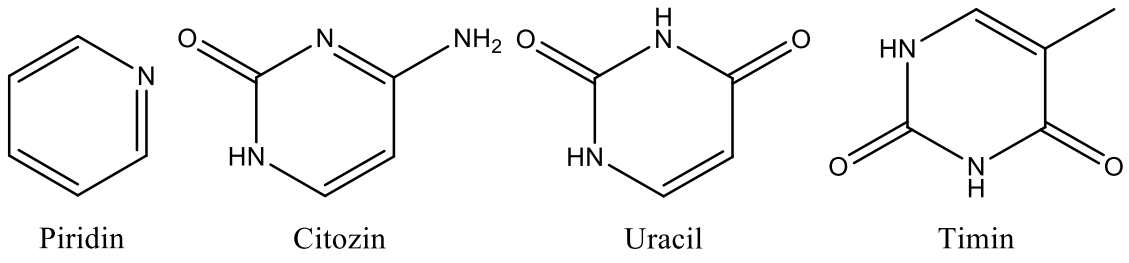
2. NUKLEINSKE KISELINE

Nukleinske kiseline, odnosno DNA i RNA građom su linearni polimeri te su glavni nositelji genetičke informacije koja se prenosi s generacije na generaciju. Struktura im se sastoji od velikog broja povezanih nukleotida, a svaki nukleotid, koji je ujedno i monomerna jedinica nukleinskih kiselina, sastoji se od šećera, fosfata i jedne od četiriju baza. Glavna okosnica nukleinskih kiselina proteže se duž lanca i sastoji se samo od šećera povezanih fosfodiesterskim vezama. Baze se u strukturi povezuju sa šećerom nukleinske kiseline i mijenjaju se od jedne do druge monomerne jedinice. Razlikujemo četiri baze od kojih su dvije derivati purina- adenin (A) i gvanin (G), a dvije pirimidina- citozin (C) i timin (T) (Slika 1). Baze se sa šećernom skupinom povezuju β-glikozidnom vezom te njihov slijed duž strukture je jedinstven i služi kao genetski kod.

PURINI:



PIRIMIDINI:

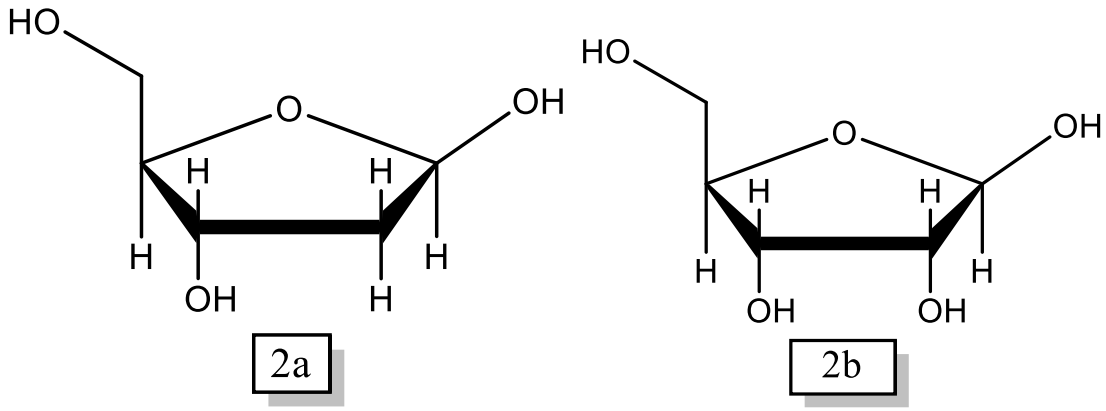


Slika 1. Dušične baze (Chemdraw)

RNA i DNA razlikuju se u kovalentnoj strukturi. Šećer u strukturi RNA je riboza, dok je u DNA deoksiriboza, a razlika je što riboza ne sadržava hidroksilnu skupinu na 2-C atomu u strukturi (Slika 2). Također, vrlo bitna razlika je što se u RNA na mjestu baze timina (T) nalazi baza uracil (U) koji je također pirimidinski derivat. Nukleinske kiseline su otporne na kemijske reakcije zbog čeka je genetički kod vrlo očuvan. Naboj na fosfodiesterskoj skupini, koja se nalazi na 5' ugljikovom atomu, je negativan stoga je i ukupan naboj molekula DNA i RNA isti. Negativan naboj molekule čini otpornima na hidrolizu i omogućuje im kretanje duž agaroznog gela pri elektroforetskim analizama.

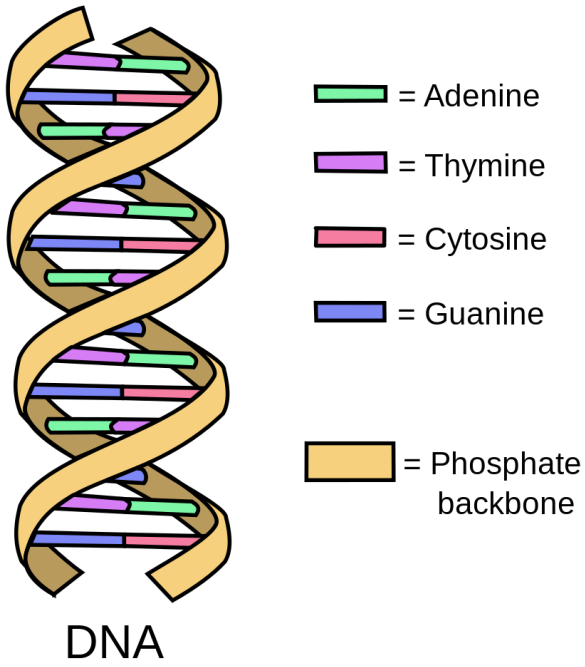
2.1. DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISELINA- DNA

Struktura DNA ima oblik dvolančane uzvojnice. Dva se lanca međusobno povezuju tvoreći jedinstveni par baza, odnosno adenin se povezuje s timinom, a citozin s gvaninom. Maurice Wilkins i Rosalind Frankiln difrakcijom X-zraka s vlaknima DNA ukazali su na pravilnu spiralnu strukturu dvolančane uzvojnice gdje su nukleotidne baze međusobno udaljene 0,34 nm. Watson i Crick na temelju tih podataka dali su prvi model strukture molekule DNA koja je davala više podataka o funkcionalnim svojstvima nukleinskih kiselina. Kako je par baza specifičan, slijed baza jednog lanca određivat će slijed baza i na drugom lancu u dvolančanoj uzvojnici. Ta strogo točna određenost slijeda baza zapravo je specifična genetska informacija svake jedinke koja se prenosi na potomke.



Slika 2. Struktura šećernog dijela nukleinskih kiselina. a) deoksiriboza; b) riboza (Chemdraw)

Deoksiribonukleinska kiselina ima suprotne spiralne polinukleotidne lance koji se omotavaju oko zajedničke osi. Glavna okosnica nalazi se na vanjskoj strani uzvojnice dok su bazni parovi u unutrašnjosti te su one gotovo okomite na os uzvojnice. Svaki spiralni okret u strukturi sačinjen je od 10 parova baza koje su međusobno razmaknute 3,4 Å što znači da se okret ponavlja svakih 34 Å dok je promjer uzvojnice 20 Å. Kako je puni okret pod kutem od 360°, a sastoji se od 10 parova baza, tako postoji rotacija od 36° po paru baza (Slika 3).



Slika 3. Struktura DNA uzvojnice. [2]

Veze prisutne u strukturi DNA su vodikove veze koje međusobno sparuju parove baza te su odgovorne za stabilnost dvostruke uzvojnice jer dolaze u velikom broju duž cijele strukture. S obzirom na to da su parovi baza gotovo naslagani jedna na drugu, one se međusobno privlače slabim van der Waalsovim interakcijama. Također to pogoduje stabilizaciji zbog hidrofobnog učinka, odnosno hidrofobne baze okrenute su u unutrašnjosti, dok su polarne skupine okrenute prema van, odnosno vodenom mediju. [1]

2.2. RIBONUKLEINSKA KISELINA- RNA

Kod većine staničnih organizama nositelj genetičkoj materijala je DNA, no kod nekih virusa genetički materijal je sadržan u RNA molekuli. Vrlo je slične strukture kao i deoksiribonukleinska kiselina te su zastupljene iste interakcije u strukturi. Razlika je u šećeru glavne okosnice koju čini riboza (Slika 2b).

Postoje nekoliko vrsti RNA u stanicama koje imaju različite funkcije, a 3 najvažnije su:

1. Glasnička RNA ili skraćeno mRNA- sudjeluje u procesu translacije odnosno sinteze proteina gdje služi kao kalup za vezanje specifičnih aminokiselina. Imaju ulogu u regulaciji životnog vijeka molekule kao i efikasnosti translacije. U stanicama je ima najmanje odnosno samo 5% od cjelokupne RNA.

2. Transfer RNA ili tRNA- također sudjeluje u procesu sinteze proteina, ali za razliku od mRNA on ima ulogu da donosi aktivirane aminokiseline do ribosoma odnosno mRNA koji određuje specifični slijed vezanja aminokiselina u protein pomoću kalupa. Sadrže oko 75 nukleotida.

3. Ribosomska RNA ili rRNA- nalazi se u ribosomima u kojima ima strukturnu kao i katalitičku ulogu koja se očituje pri sintezi proteina (formiranje specifične kemijske veze - peptidne veze). Najzastupljenija u stanicama.

3. ELEKTROFORETSKE TEHNIKE ZA ANALIZU NUKLEINSKIH KISELINA

Analitičke tehnike u laboratorijima za analizu nukleinskih kiselina uvelike su se razvile kroz povijest. Omogućuju nam istraživanje uloge određenih gena, ranije otkrivanje bolesti i njihovu prevenciju, te razdvajanje i pročišćivanje nukleinskih kiselina. Jedna od značajnih tehnika u analizi DNA i RNA je elektroforetska tehnika. Analizu DNA pomoću elektroforeze službeno je otkrio Vin Thorne 1960. godine za vrijeme razdvajanja DNA fragmenata virusa. Elektroforeza se zasniva na procesu gdje otopljena tvar ili čestica efektivnog naboja putuje pod djelovanjem električnog polja po viskoznom puferu. Čestica putuje prema jednoj od elektroda ovisno o njenom naboju (pozitivna čestica putuje prema negativnoj elektrodi, anodi, a negativna prema pozitivnoj elektrodi, katodi). Elektroforeza omogućuje razdvajanje DNA i RNA molekula na osnovi njihove veličine i konformacije. Tijekom elektroforeze nukleinske kiseline putuju prema pozitivnoj elektrodi s obzirom na njihov negativni neto naboj, pri čemu manji fragmenti putuju brže kroz pufer.

Pokretljivost uzorka, odnosno elektroforetska pokretljivost, u viskoznom puferu ovisi o brojnim čimbenicima kao što su:

- Električni naboj, veličina, oblik, koncentracija, stupanj hidracije i disocijacije čestice, odnosno neto naboj
- Temperatura, pH, viskoznost te ionska jakost pufera
- Jakost električne struje
- Vrijeme putovanja

Utjecaj ovih čimbenika utječe na uspješnost provedenog eksperimenta, a isto tako i na konačne rezultate. Potrebno je obratiti pažnju na vrstu metode koja se koristi za analizu te na vrstu analiziranog uzorka. Elektroforeza nukleinskih kiselina obično se odvija u poliakrilamidnom gelu ili agaroznom gelu, a on se bira s obzirom na vrstu tehnike i uzorka koji se podvrgava elektroforezi. Za razdvajanje malih fragmenata (do 500 bp) najčešće se koristi poliakrilamidni gel veličinom pora 5-100 nm, a agarozni gel koristi se za uzorke veličine molekula od 100- 50,000 bp. [3]

3.1. VRSTE ELEKTROFORETSKIH TEHNIKA

Postoji više tipova i načina izvođenja metoda elektroforeze, a biraju se s obzirom na uzorak koji se želi analizirati. Metoda mora odgovarati veličini uzorka, njegovoj konfiguraciji i naboju. Isto tako, mora se obratiti pozornost i na odabir pufera te jakosti provođenja struje pri provođenju elektroforeze. Nukleinske kiseline u većini se slučajeva analiziraju metodom elektroforeze na agaroznom gelu. [4]

3.1.1. Slobodna elektroforeza

Provodi se u čistom puferskom sustavu u cijevi koja ima nalik na slovo U. Ta je cijev jednim krajem spojena na anodu, a drugi kraj na katodu pri čemu čestice putuju raznim brzinama prema jednoj od elektroda. Ova vrsta elektroforetske tehnike najčešće se koristi za analizu, odnosno odvajanje bjelančevina.

3.1.2. Zonska elektroforeza

Provodi se unutar granica čistoga elektroforetskog nosača gdje je uzorak nakon odvajanja izoliran u pojedinačnoj zoni. Nosač se nalazi u elektroforetskoj kadi s dva puferska odjeljka spojena s anodom i katodom. Ova se metoda dijeli s obzirom na korišteni elektroforetski nosač:

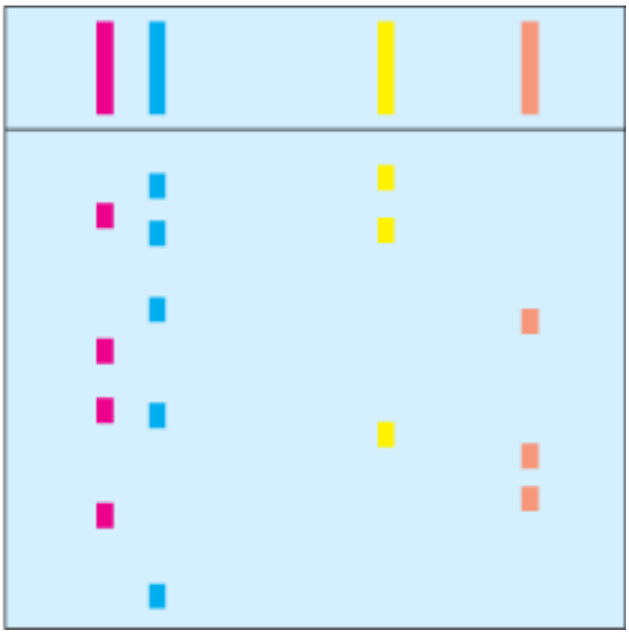
1. Elektroforeza na filtarskom papiru- Daje relativno loše rezultate zbog grube građe i nejednakosti veličine pora filtarskog papira.
2. Elektroforeza na acetatnoj celulozi- Metoda se zasniva na razlici u gustoći naboja. Acetatna celuloza je glatke površine i jedinstvene veličine pora pa se tako protok nabijenih čestica kroz elektroforetski nosač odvija lakše i pravilnije.
3. Elektroforeza na agarnom gelu- Daje rezultate slične elektroforezi na acetatnoj celulozi, ali smjesa od agaropektina i agaroze pridonosi pojavi elektroendosmoze[1] koja ima nepovoljan učinak na odvijanje nabijenih čestica.

[1] Elektroendosmoza- pojava u tijeku elelektroforeze gdje elektroforetski nosači u dodiru sa vodom postaju negativno nabijeni što utječe na razvijanje nabijenog materijala tokom postupka elektroforeze.

4. Elektroforeza na agaroznom gelu- Veličine pora agaroznog gela dovoljno su velike da omogućuju slobodan prolaz velikim molekulama uzorka kroz gel. Nabijene se čestice odvajaju ili razdvajaju prema gustoći naboja.
5. Elektroforeza na škrobnom gelu- Metoda se također zasniva na razdvajanju makromolekularnih iona na osnovi površinskog naboja i molekularne veličine. Uspješnost elektroforeze ovisi o kakvoći škrobnog gela.
6. Elektroforeza na akrilamidnom gelu- Metoda nije primjenjiva za razdvajanje uzorka većih molekula te se koristi za razdvajanje molekula sa sličnom gustoćom naboja.

3.1.3. Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje je elektroforetska tehnika koja se zasniva na razdvajanju bjelančevina na osnovi razlike u njihovim izoelektričnim točkama. Izoelektrična točka određene bjelančevine je pH vrijednost pri kojoj je neto naboj bjelančevine ukupan nuli. Na katodi i anodi kontinuirano se odvijaju reakcije kojima nastaju H_3O^+ i OH^- ioni pri čemu se regulira pH vrijednost. Bjelančevine zatim putuju u električnom polju prema anodi i katodi ovisno o naboju, točnije prema onoj elektrodi koja ima pH vrijednost jednaku njihovoj izoelektričnoj točki.



Slika 4. Izoelektrično fokusiranje. [5]

3.1.4. Izotahoforeza

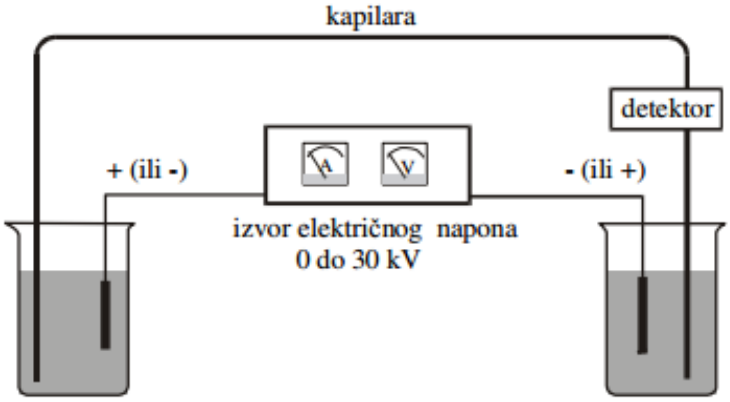
Posebna je vrsta elektroforetske tehnike i provodi se u diskontinuiranom elektroforetskom sustavu. Umjesto elektroforetskog nosača prisutan je vodeći elektrolit koji sadrži ione visoke pokretljivosti te završni elektrolit koji sadrži ione niske pokretljivosti. Na granici tih dviju elektrolitskih tekućina nalazi se granični sloj na koji se nanosi uzorak pri čemu se nabijene molekule uzorka raspodjeljuju između te dvije elektrolitske tekućine.

3.1.5. Dvosmjerna elektroforeza

Dvosmjerna elektroforeza je spoj dviju elektroforetskih tehnika. Najčešće se koriste elektroforeza u akrilamidnom gelu u jednome smjeru te izoelektrično fokusiranje u drugom smjeru pri čemu se dobiju podaci o izoelektričnoj točki kao i o molekulskoj masi pojedinih molekula u uzorku.

3.1.6 Kapilarna elektroforeza

Elektroforetska tehnika kojoj se nabijene čestice kreću kroz kapilarnu cijev koje mogu biti ispunjene gelom ili puferskom viskoznom otopinom. Kapilara je sa elektrodama uronjena u dvije čaše ispunjene puferskom otopinom, a izvor električne struje spojen je na elektrode. Provođenjem električne struje, uspostavlja se električni napon koji stvara električno polje kroz kapilaru. Uzorak se nanosi na ulaznom kraju kapilare te se nabijene čestice gibaju duž kapilare pod utjecanjem električnog napona, a na drugom se kraju kapilare nalazi detektor koji daje podatke o molekulskim vrstama koje migriraju kroz kapilaru. Ova metoda, uključujući elektroforezu na agaroznom i poliakrilamidnom gelu, najčešće se koristi za detekciju nukleinskih kiselina.



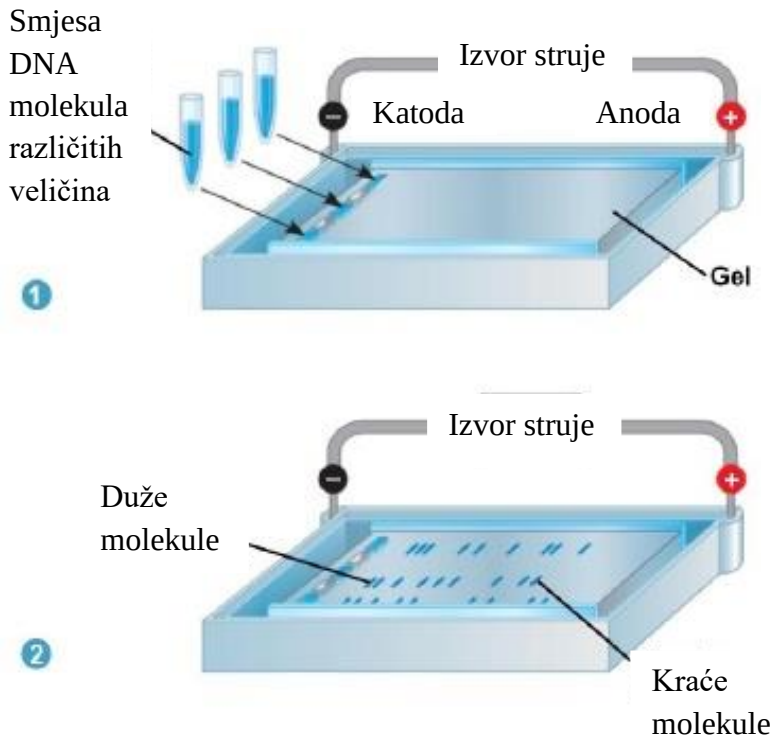
Slika 5. Shematski prikaz kapilarne elektroforeze. [6]

4. PRIMJENA ELEKTROFOREZE U AGAROZNOM GELU

Kako nukleinske kiseline u neutralnim i slabo lužnatim otopinama imaju približno jednak električni naboj, one se u slobodnoj otopini ne mogu razdvojiti elektroforetski. Iz istog se razloga za njihovo razdvajanje koriste molekulska sita gdje se međusobno nukleinske kiseline razdjeljuju na temelju veličine i oblika molekula. Korištena molekulska sita su agarozni gel za razdvajanje nukleinskih kiselina velikih molekulskih masa i poliakrilamidni gel za razdvajanje malih molekula uzoraka. Agarozni gel u elektroforetskim metodama se najčešće koristi za analizu i pročišćivanje RNA i DNA fragmenata veličine od 1000- 23000 parova baza. [7]

4.1. OPIS METODE

Metoda se provodi tako da se pripremi otopina agaroze koja se nanosi u elektroforetsku kadicu te se okomito umetne <<češalj>> za jažice, nakon toga se otopina agaroze određeno vrijeme polimerizira. U pripremljenu otopinu agaroze dodaje se boja za detekciju. Danas se detekcija radi primjenom fluorescentnih interkalatorskih boja kao što je npr. SYBR GREEN koji je zamijenio Etidijum-bromid koji ima dokazana mutagena i kancerogena svojstva. U otopinu agaroze, kao i u ispitivani uzorak, dodaje se otopina pomoću koje se kasnije može detektirati uzorak, a to su najčešće fluorescentna bojila (SYBER zeleno ili Etidium bromid). DNA vrpce tako je moguće vidjeti pod UV svjetlom te je moguće detektirati dobivene rezultate. Važno je polimerizirati gel na ravnoj podlozi kako bi dobili ravnomjerno raspoređen agarozni gel po kojemu će putovati uzorci. Tijekom elektroforeze agarozni gel je uronjen direktno u pufersku otopinu nakon čega se nanosi uzorak u jažice i pušta struja određene jakost pri čemu započinje kretanje uzorka kroz agarozni gel.



Slika 6. Prikaz elektroforeze u agaroznom gelu. [8]

Kako je prije bilo spomenuto, na povoljne rezultate elektroforeze utječe i svojstvo agaroznog gela, odnosno debljina i njegova koncentracija. Za detekciju nukleinskih kiselina primjenjuje se agarozni gel debljine sloja od 1 do 10 mm i važno je odrediti i veličinu primjenjenog <<češlja>> za jažice kako jažice ne bi bile preduboke ili preplitke. U suprotnom, uzorak DNA i RNA bi ulegao u jažice te bi prolazak kroz agarozni gel bio otežan ili bi uzorak izašao iz jažica. Ako je koncentracija agaroznog gela velika, putovanje uzorka će biti otežano. Elektroforeza je moguća zbog električnog otpora gela tijekom provođenja električnog napona prije čemu se uspostavlja gradient jakosti električnog polja koji je ovisan o debljini sloja gela. Upravo zbog uspostavljenog gradijenta jakosti električnog polja, fragmenti DNA i RNA mogu prolaziti kroz gel prema pozitivnoj elektrodi (katodi), zbog negativnog naboja molekula. Veći fragmenti putovati će sporije, a manji brže kroz gel pri elektroforezi. Jakost struje određena je za svaku metodu elektroforeze i ovisi o ispitivanom uzorku. Predugo provođenje elektroforeze pri visokoj jakosti struje može uzrokovati nemogućnost detekcije uzorka koji će otputovati predaleko u agaroznom gelu, a moguće je da uzorak dođe do samog ruba agaroznog gela. U suprotnom, pri niskoj jakosti struje i prekratkom vremenskom razdoblju provođenja elektroforeze, uzorak se nedovoljno razdvaja od smjese pri čemu neće biti moguće detektirati uzorak.

Analiza uzorka započinje odmah nakon provedbe elektroforeze. Agarozni se gel osvjetljava UV lampom, a za trajni zapis rezultata, osvijetljeni se gel fotografira te se rezultati pohranjuju u obliku trajnog zapisa tiff i jpg formata. Kako bi mogli analizirati dobivene rezultate elektroforeze u agaroznom gelu, koriste se DNA standardi koji se najčešće nanose u prvu i zadnju jažicu u gelu. DNA standardi su specifični, točno određene veličine DNA segmenti koji se koriste za određivanje veličine dobivenih nepoznatih i poznatih uzoraka (DNA, RNA ili PCR produkti). [9]

5. EKSPERIMENTALNI RAD

5.1. MATERIJALI

5.1.1. Pribor i kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije:

- SYBR Safe™ DNA gel stain (Eugene, Oregon, USA)
- Agaroza (SIGMA, USA)
- 1x TBE pufer (89 mM Tris base; 89 mM borna kiselina; 2mM EDTA, pH 8,0)
- DNA marker: MassRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas, USA)
- DNA nepoznati uzorak
- RNA nepoznati uzorak
- DNA izolat
- RNA izolat
- PCR
- DNA Gel Loading Dye (TermoFisher SCIENTIFIC, USA)

U radu je korišten slijedeći pribor:

- Izvor struje: CONSORT 100V- 400mA
- Vaga (KERN, Velika Britanija)
- Uređaj za detekciju (BIO-RAD, Chemidoc XRS Chemiluminescent Gel Documentation Cabinet)
- Kadica za agarozni gel i pripadajući češalj za jažice
- Erlenmeyer-ova tikvica i petrijeva zdjelica
- Automatska propipeta

5.2. IZRADA AGAROZNOG GELA

Tokom cijelog postupka izvođenja elektroforeze potrebno je nositi zaštitnu laboratorijsku odjeću, odnosno kutu, naočale i rukavice. 10% agaroza priprema se tako da se 0,3 grama agaroze otopi u 1x TBE puferu u Erlenmeyer-ovoj tikvici. Otopina se zatim zagrijava do vrenja tako da se otvor tikvice poklopi Petrijevom zdjelicom kako otopina ne bi isparila. Nakon zagrijavanja otopina se promiješa i provjeri jesu li se otopili svi kristali agaroze, u suprotnom će oni ometati razvijanje molekula tokom elektroforeze. Ako se kristali nisu otopili, potrebno je postupak zagrijavanja ponoviti sve dok se sav sadržaj ne otopi u otopini pufera. Sadržaju se doda 3μL SYBER Safe koji će otopinu obojiti u blago narančastu boju te se ohladi na približno 40°C i ulije u kadicu koja se prethodno na rubovima ravnomjerno obloži kako gel ne bi iscurio. Na kadicu sa gelom se lagano stavi češalj za jažice i agarozni gel se tako ostaviti polimerizirati 30 min zaštićen aluminijskom folijom od svijetla (Slika 7).



Slika 7. Izrada agaroznog gela u kadici sa češljom

5.3. NANOŠENJE UZORKA

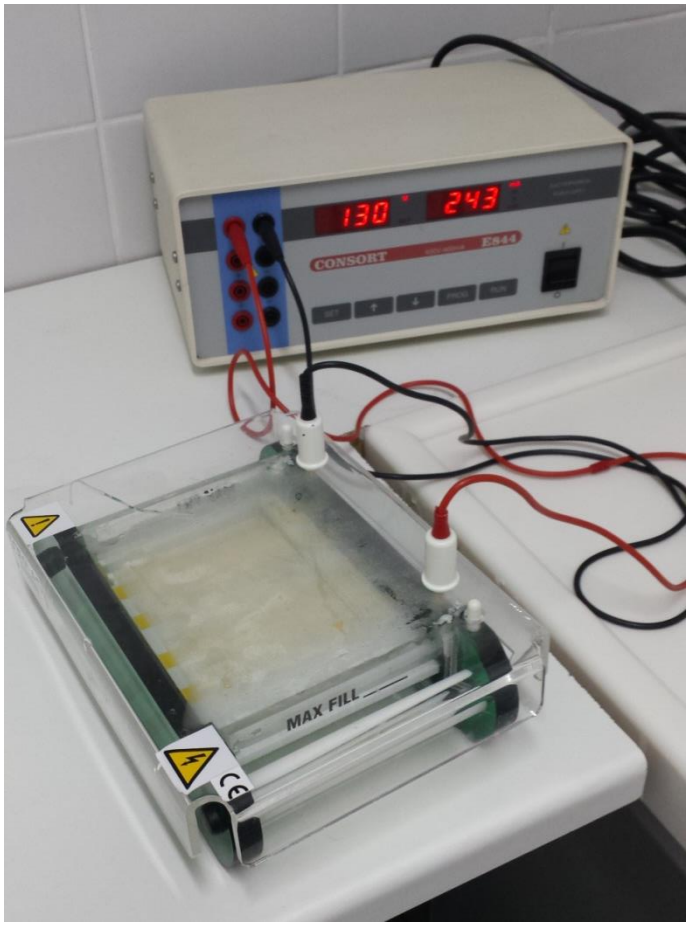
Nakon što se agarozni gel polimerizirao, češalj se oprezno izvadi kako se jažice ne bi deformirale te se ukloni zaštita kojom smo obložili kadicu. Agarozni gel u kadici stavi se u uređaj za elektroforezu gdje se do oznake ulije 1x TBE pufer tako da natopi gel. Zatim se dobiveni uzorci DNA i RNA pomiješaju sa DNA Loading Dye otopinom kako bi uzorak obojio u plavo i kasnije mogao identificirati preko UV lampe. DNA marker MassRuler nanosi se u prvu i zadnju jažicu u volumenu od 5µL pomoći automatske propipete vrlo oprezno kako ne bi probušili agarozni gel te da uzorak nanesemo točno u utor jažice. Zatim se jažice redom popunjavanju izolatom, uzorkom te PCR produktima (Tablica 1).

Tablica 1. Prikaz korištenih uzoraka te pripadnih volumena za svaku od jažica u agaroznom gelu

Redni broj jažice	Uzorak	Volumen uzorka/ µL
1.	DNA marker	5
2.	DNA izolat	6
3.	DNA izolat	6
4.	RNA analizirani uzorak	6
5.	DNA analizirani uzorak	6
6.	PCR	6
7.	PCR	6
8.	DNA marker	5

5.4. ELEKTROFOREZA

Kada smo nanijeli sve uzorke, uređaj za elektroforezu se zatvori i spoji na protok struje CONSTOR pri 130 V u vremenskom periodu od 30 min. Uređaj se povezuje na protok struje tako da su jažice sa uzorcima na strani anode, kako bi se negativno nabijene molekule kretale po agaroznom gelu prema katodi. Ako se u puferskoj otopini razvijaju mjehurići na anodi i katodi, tada je elektroforeza uspješno započela. Poželjno je cijelu aparaturu za elektroforezu pokriti aluminijskom folijom s obzirom da je SYBER Safe osjetljiv na svjetlost.



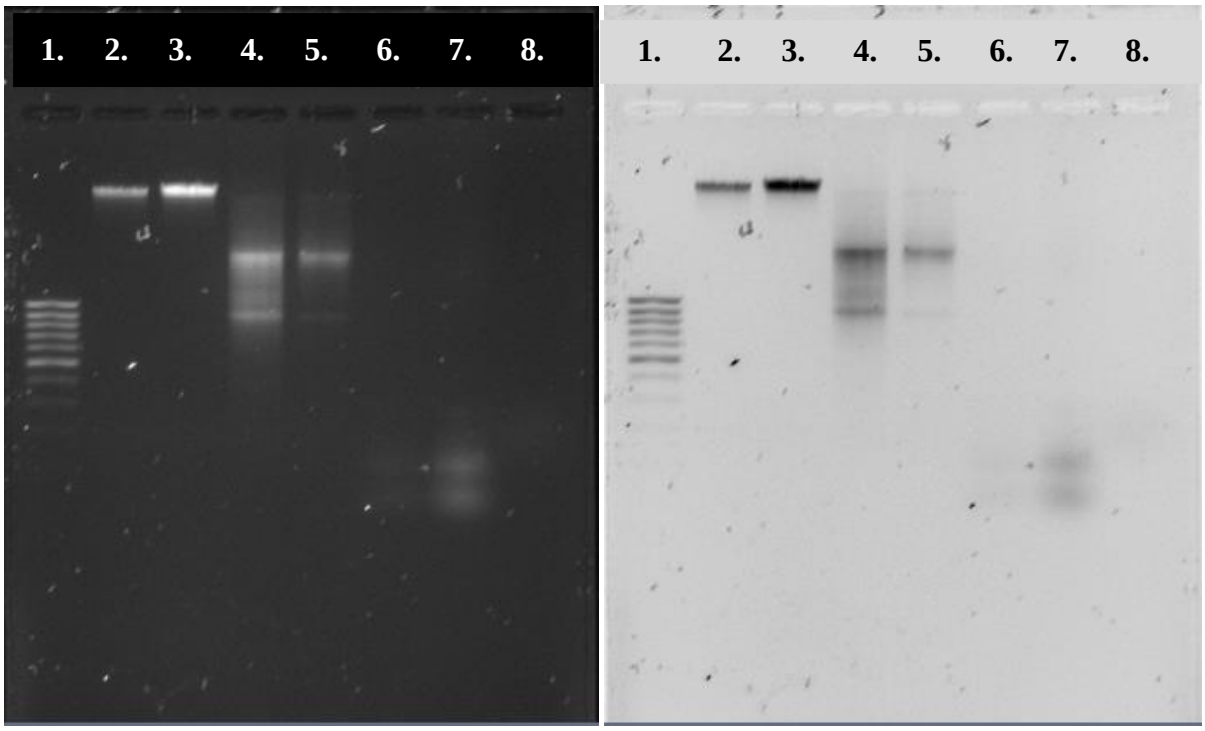
Slika 8. Provođenje elektroforeze pri jakosti struje od 130 V u vremenskom razdoblju od 30 min

Po isteku vremena elektroforeze potrebno je izvor struje prekinuti i isključiti CONSTOR uređaj te ga odspojiti od posude u kojoj se nalaze uzorci. Kadica se izvadi, lagano prebriše od puferske otopine, oprezno obloži aluminijskom folijom i prenese do uređaja. Agarozni se gel oprezno izvadi iz kadice i prebaci u uređaj za detekciju.



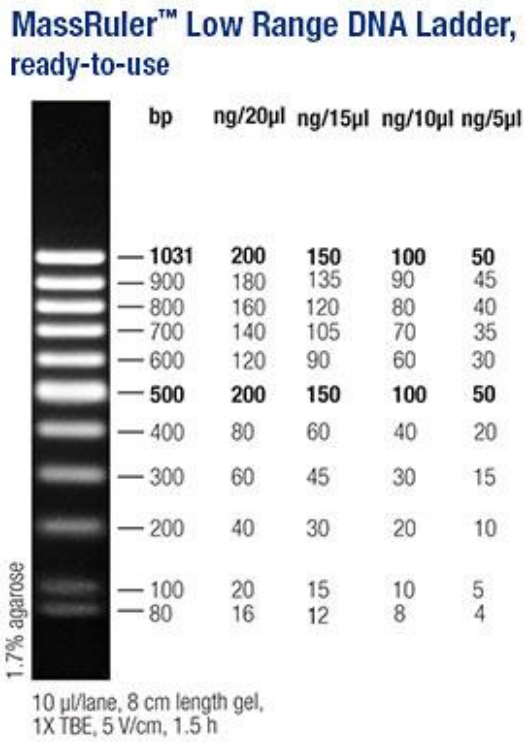
Slika 9. Kemoluminiscencijski uređaj za vizualizaciju rezultata

5.5. OBRADA DOBIVENIH REZULTATA



Slika 10a i 10b. Rezulti elektroforeze u agaroznom gelu. a) regularni (CB) i b) invertni prikaz rezultata (BC).

Fotografiranjem dobivenih rezultata elektroforezom na agaroznom gelu dobije se fotografija na kojoj su vidljive jažice u koje su nanaseni uzorci. Uzorak koji se gibao duž agaroznog gela tokom elektroforeze nalazi se ispod određene jažice u kojoj je isti uzorak bio dodan i vidljiv je u obliku bijelih crta na slici broj 10a i crnih crta na slici broj 10b. DNA marker se elektroforezom raspoređuje duž agaroznog gela u obliku isprekidanih crta. Svaka crta markera označava točno određenu kvantifikaciju i veličinu DNA fragmenta te se usporedbom sa zadanim ispitivanim fragmentom DNA može odrediti veličina uzoraka. Na slici 11. prikazane su vrijednosti korištenog DNA markera pomoću kojih se klasificira određeni uzorak fragmenata RNA i DNA koji se želi ispitati i analizirati. DNA izolat sastoji se od samo jedne vrste fragmenata DNA stoga elektroforezom daje samo jednu jasnu crtu pod UV svjetlom, dok je PCR nešto slabije vidljiv.



Slika 11. Primjenjeni DNA marker. Veličina 1KB. [12]

6. RASPRAVA

Ovim eksperimentalnim postupkom elektroforeze u agaroznom gelu bio je cilj opisati provođenje postupka metode za analizu nukleinskih kiselina, ne i za samu njihovu analizu. Iz dobivenih rezultata može se vidjeti kako se DNA marker u jažici broj 1. pravilno rasporedio duž agaroznog gela te su vidljivi svi raspoređeni fragmenti kako je određeno prema specifikacijama proizvođača (Slika 11). U jažici pod rednim brojem 2. i 3. nalazi se DNA izolat koji je najjasnije vidljiv u dobivenim rezultatima. Ispitivani uzorak DNA fragmenata vidljiv je jače od korištenog uzorka RNA, ali oba uzorka sadrže tri fragmenta različitih masa što je vidljivo preko tri jasne razvijene crtice duž agaroznog gela. PCR produkti u jažici 6. i 7. manje su vidljivi od ostalih nanesenih uzoraka u jažice dok je DNA marker u jažici broj 8. u potpunosti iščeznuo, a pretpostavlja se da je uzrok tomu neprecizno nanošenje pri čemu je došlo do potpunog istjecanja markera iz jažice. Svaki se uzorak usporedno rasporedio duž gela što znači da je elektroforeza provedena pri optimalnoj jakosti struje i agaroza se u TBE puferu u potpunosti otopila.

7. ZAKLJUČAK

Ovim završnim radom ispitivala se gel elektroforeza kao metoda za analizu nukleinskih kiselina. Krajnji rezultati su bili zadovoljavajući s obzirom da nisu namijenjeni za daljnje analize. Može se reći kako su elektroforetske tehnike vrlo efikasne, brze, jednostavne i točne metode za biokemijske analize DNA i RNA. Sama provedena elektroforeze u agaroznom gelu vremenski je trajala oko 90 minuta, što je prihvatljivo s obzirom na druge analitičke tehnike koje mogu trajati po nekoliko dana. Metoda je vrlo pouzdana i točna što je vrlo važno za dobivanje pouzdanih rezultata. Također, metoda je jeftina jer ne zahtjeva skupe aparate za provođenje elektroforeze. Jedini nedostatak elektroforeze u agaroznom gelu je što zahtjeva preciznost i točnost analitičara koji izvodi analizu. Strogo se mora obratiti pažnja tijekom nanošenja uzorka u uske, prozirne jažice kako ne bi došlo do probadanja jažica ili kako uzorak ne bi izašao u pufersku otopinu. Važno je koristi referentni uzorak poznatih vrijednosti kako bi se na temelju tih rezultata mogle usporediti vrijednosti analiziranog uzorka. Elektroforetske tehnike imaju široku primjenu u analitičkoj kemiji, a posebno u područuju biokemije za analizu proteina i nukleinskih kiselina.

8. LITERATURA

[1] Jermy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer; Biokemija, 1. izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[2] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_simple2.svg

[3] Svetlana Makovets, DNA electrophoresis: methods and protocols, Humana press, New Jersey, 2013.

[4] Božidar Štraus, Ana S.-Rukavina, Franjo Plavšič i suradnici; Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju, Medicinska naklada, Zagreb, 1997.

[5] http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor293.htm

[6] https://www.fer.unizg.hr/_download/repository/Ivan_Piljac_-_Elektroforeza.pdf

[7] Ivan Piljac; Elektroforeza, Sveučilište u zagrebu, Zagreb, 2015.

[8] http://thenationonlineng.net/how-does-dna-testing-work-2/

[9] Keith R. Mitchelson, Jing Cheng; Capillary electrophoresis of nucleic acid, Volume 162, Humana press, New Jersey, 2001.

[10] Andreja Ambrović Ristov; Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2007.

[11] D. Rickwood, B. D. Hames; Gel electrophoresis of nucleic acids, IRL Press Ltd. (1982).

[12] http://eshop.biogen.cz/massruler-dna-ladders?version=mobile&crcy=EUR

[13] program ChemDraw Ultra 12.0.2.1076