



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ

Втор циклус

Штип

Марија Ѓорѓевска

**ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ, ЗНАЧЕЊЕ И ПРИМЕНА НА ДНК – ГЕЛ
ЕЛЕКТРОФОРЕЗА**

-СПЕЦИЈАЛИСТИЧКИ ТРУД-

Штип, февруари 2023

Комисија за оценка и одбрана

- Ментор:** проф. д-р Невенка Величкова
Универзитет „Гоце Делчев“
- Член** проф. д-р Викторија Максимова
Универзитет „Гоце Делчев“
- Член** проф. д-р Елена Дракалска-Серсемова
Универзитет „Гоце Делчев“

Датум на одбрана: 2.2.2023

Датум на промоција: 8.10.2022

Благодарност

Голема благодарност ѝ укажувам на мојата менторка,

проф. д-р Невенка Величкова.

Најпрво за самото посветено време, кое денес најмалку го има - бевте присутни секогаш кога ми беше потребна помош, благодарност за дадените насоки, оти за да оди човек по добар пат многу е битно кој ќе го насочи сето тоа Вие го направивте со поддршка, професионалност и мотивираност.

Уште еднаш, од сè срце Ви се заблагодарувам за сета таа истрајност што ја имате, Ви се заблагодарувам што ме усовршивте и што ме кренавте на уште една скала повисоко.

Професорке, секој би посакал да има ментор како Вас!

ВИ БЛАГОДАРАМ

ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ, ЗНАЧЕЊЕ И ПРИМЕНА НА ДНК – ГЕЛ ЕЛЕКТРОФОРЕЗАТА

(Краток извадок)

Со овој труд сакаме да ја потенцираме важноста и значењето на ДНК - гел електрофорезата и нејзината примена во различни области од медицината кои се базираат на истражување на хуманиот геном, наследувањето на одредени болести и здравјето воопшто.

Имајќи го предвид принципот на работа на електрофорезата (раздвојување на макромолекули, врз база на нивната големина, облик и електризирање низ гел во кој се пропушта еднонасочна електрична струја), електрофорезата на нуклеински киселини се заснова на раздвојување на молекулите на ДНК и РНК, врз база на нивната големина и конформација како и фрагментирање на ДНК со помош на рестрикциони ензими и нивно визуализирање. Електрофорезата на нуклеинските киселини најчестото се одвива во агарозен гел.

ДНК електрофорезата нуди можност за испитување на хуманиот геном, за исцртување на генетските мапи и со нејзина примена се испитуваат голем број на физиолошки и метаболични процеси кои се поврзани со голем број на функции на организмот, неговата исхрана и севкупна здравствена состојба.

Електрофорезата е исклучително важна лабораториска метода која служи за раздвојување на протеинските молекули и одредување на нивните генетски варијанти во различни телесни течности како крв, серум, плазма, урина или цереброспинален ликвор. На тој начин секој протеин, нуклеинска киселина, ген или егзон создава своја слика или генетски принт кој се разликува кај различни видови на организми.

Клучни зборови: раздвојување на макромолекули, нуклеински киселини, рестрикциони ензими.

BASIC PRINCIPLES, MEANING AND APPLICATION OF DNA - GEL ELECTROPHORESIS

Abstract

With this paper, we want to highlight the importance and significance of DNA gel electrophoresis and its application in various areas of medicine that are based on human genome research, the inheritance of certain diseases and health in general.

Taking into account the working principle of electrophoresis (separation of macromolecules, based on their size, shape and electrification through a gel through which a direct electric current is passed), electrophoresis of nucleic acids is based on the separation of DNA and RNA molecules, on based on their size and conformation as well as DNA fragmentation using restriction enzymes and their visualization. Nucleic acid electrophoresis is usually performed in an agarose gel.

DNA electrophoresis offers the opportunity to examine the human genome, to draw genetic maps, and with its application, a large number of physiological and metabolic processes are examined that are related to a large number of functions of the body, its diet and overall health condition.

Electrophoresis is an extremely important laboratory method that serves to separate protein molecules and determine their genetic variants in different body fluids such as blood, serum, plasma, urine or cerebrospinal fluid. In this way, each protein, nucleic acid, gene or exon creates its own image or genetic print that differs in different types of organisms.

Key Words: separation of macromolecules, nucleic acids, restriction enzymes.

СОДРЖИНА

1.	Вовед (Introduction).....	8
1.1	Улогата и значењето на нуклеинските киселини	9
1.2	ИСТОРИСКИ РАЗВОЈ НА ЕЛЕКТРОФОРЕЗАТА.....	11
1.3	ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА ЕЛЕКТРОФОРЕЗАТА.....	11
1.4	ЗНАЧЕЊЕ НА ЕЛЕКТРОФОРЕЗАТА.....	13
1.5	ФАКТОРИ ОД КОИ ЗАВИСИ ЕЛЕКТРОФОРЕЗАТА.....	15
1.6	ВИДОВИ НА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА.....	18
1.6.1	Слободна електрофореза.....	18
1.6.2.	Зонска електрофореза.....	19
1.6.2.1	Електрофореза со филтер хартија.....	19
1.6.2.2	Електрофореза на целулоза ацетат (CAGE).....	20
1.6.2.3	Електрофореза на скробен гел.....	20
1.6.2.4	Електрофореза на агар гел (AGE).....	20
1.6.2.5	Електрофореза на полиакриламиден гел(PAGE).20	
1.6.2.6	Електрофореза во агарозен гел (SDS PAGE).....	21
1.6.2.7	Имуноелектрофореза.....	21
1.6.2.8	Капиларна електрофореза.....	21
1.6.3	ДНК – гел електрофореза.....	22
1.6.3.1	Полиакриламидна гел електрофореза (ПАГЕ)....	22
1.6.3.2	Агарозна гел електрофореза.....	23
2.	ЦЕЛ НА ТРУДОТ.....	25
3.	МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ТРУДОТ.....	26

3.1 Изведување на ДНК - гел електрофореза.....	27
3.2 Улогата на лаборантот во ДНК - гел електрофореза.....	34
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	36
Заклучок (Concluding remarks).....	39
Користена литература (References).....	40

1. Вовед (Introduction)

Протеините претставуваат органски соединенија кои се застапени со околу 20% од вкупната човекова телесна маса. Од протеинска природа се ензимите, некои хормони, антителата, факторите на коагулација, нуклеински киселини, хемоглобинот и многу други соединенија. Самите соединенија се делат на прости и сложени во зависност од нивната хемиска градба. Во сложени соединенија влегуваат **нуклеопротеидите**, како комплекси помеѓу протеини (хистони) и нуклеински киселини, кои што имаат незаменлива улога во процесите на наследувањето и биосинтезата на протеините.

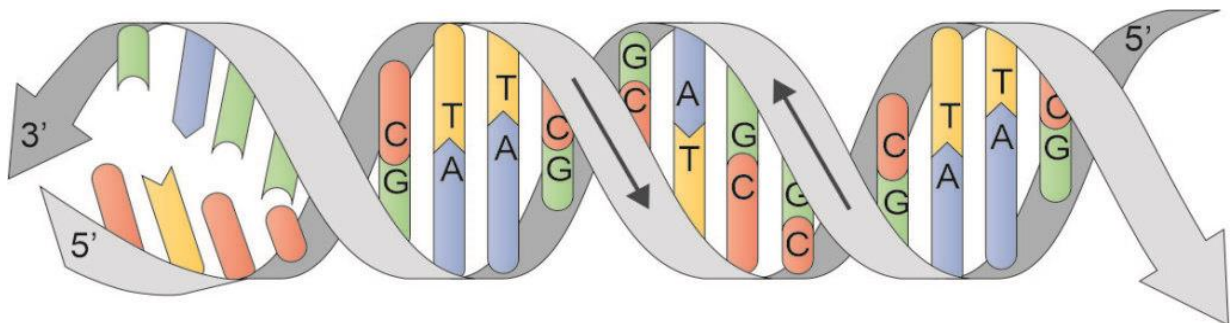
1.1 Улогата и значењето на нуклеинските киселини

Генетскиот материјал во сите живи организми е запишан во молекулата на ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина). Целокупната секвенца од ДНК во еден организам се нарекува геном.

Според, Бошнаковски (2018), ДНК е молекула која во себе ги содржи сите информации за градбата и функцијата на секоја клетка. Со нејзината репликација се овозможува континуирано пренесување на информациите од една генерација на друга. Информациите за синтеза на протеини се кодирани во точно определени сегменти кои се нарекуваат гени. За да стане информацијата функционална, во процесот се вклучуваат рибонуклеинските киселини. Притоа, при процесот на транскрипција, информационата рибонуклеиска киселина (иРНК) се синтетизира на база на кодирачката секвенција од ДНК. Таа ја носи информацијата за точниот аминокиселински редослед во протеините. На база на иРНК, со посредство на транспортната (тРНК) и рибозомалната (рРНК) рибонуклеинска киселина, се синтетизираат протеините во рибозомите. Овој процес се нарекува транслација. Во клетките генетскиот материјал е организиран во структури наречени хромозоми. Гените определуваат особини како ние изгледаме, како растеме и какви генетски болести може да имаме. Гените ги контролираат сите аспекти во животот од еден организам, со кодирање на продуктите кои се одговорни за развој, репродукција и друго. Процесите со кои гените ги создаваат генетските продукти и како продуктите кои ја остваруваат нивната функција се нарекува генетско прикажување (експресија). Процесите се состојат од: препишување (транскрипција) и преведување (транслација). Во процесот на препишување на информациите од ДНК, нуклеинската киселина се обвиткува локално на две единични вериги, а ензимот РНК полимераза создава една копија од РНК врз едната верига од ДНК (матрична верига од ДНК). Информација од базните секвенци која ја определува аминокиселинската секвенца во протеинот се нарекува генетски код. Во било кое време, само специфичен комплет гени во соодветниот геном се активни. Размената на генетскиот материјал помеѓу хромозомите, односно рекомбинацијата, се

остварува со ензими кои ги сечат и ги пресоединуваат молекулите на ДНК. Честа појава во мејозата кога се случуваат физички размени во хомологните хромозоми. Се создаваат генетски карти при што имаат генетски локус кој го покажува местото на генот во картата (и во хромозомот за кој се однесува). Генетската оддалеченост помеѓу гените во ист хромозом или генетскиот локус кој го покажува местото на генот во картата (и во хромозомот за кој се однесува) се пресметува од резултатите на генетските вкрстувања со мерење бројот на рекомбинации, односно процентот со кој се преуредуваат алелите од родителите во потомците. Единицата за генетска оддалеченост се вика картна (мапна) единица. Рекомбинантната ДНК технологија се користи за создавање многу антибиотици, хормони, инсулинот и др. Во судската медицина ДНК типизацијата се користи во случаите на татковство, криминални случаи и антрополошки истражувања.

Квалитативна анализа и квантитативна анализа на ДНК најчесто се прави со процесот на електрофореза. Во овој случај ДНК - гел електрофореза, се прави со помош на агарозен или полиакриламиден гел, во зависност од големината на фрагментите кои сакаме електрофоретски да ги сепарираме.



Слика 1: Структура на ДНК молекула

Figure 1. Structure of a DNA molecule

1.2 ИСТОРИСКИ РАЗВОЈ НА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА

Една од најзначајните техники во анализите на ДНК е електрофорезата.

Електрофорезата овозможува раздвојување на ДНК молекула врз основа на нејзината големина и конформација. Со тек на електрофореза, фрагментите од ДНК со негативен полнеж патуваат кон позитивната електрода со тоа што најмалите фрагменти патуваат први низ пуферот.

Anre Tiselius прв ја вовел електрофорезата како квантитативна метода во 1930 година, за истата има добиено Нобелова награда во 1948 год.

Според *Беркеш* 1951 год. електрофорезата е најважна метода за испитување и скрининг на нуклеотидни секвенци и синтезата на протеините.

Во 1960 год. *Vin Thorne* раздвојувал ДНК фрагменти на вирус, со помош на електрофорезата.

Shapiro, во 1967 год. со користење на примерок за анализа на подлога на акриламиден гел, потврдува дека со помош на електрофорезата протеините се движат во зависност од нивната големина и молекуларна тежина.

1.3 ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА

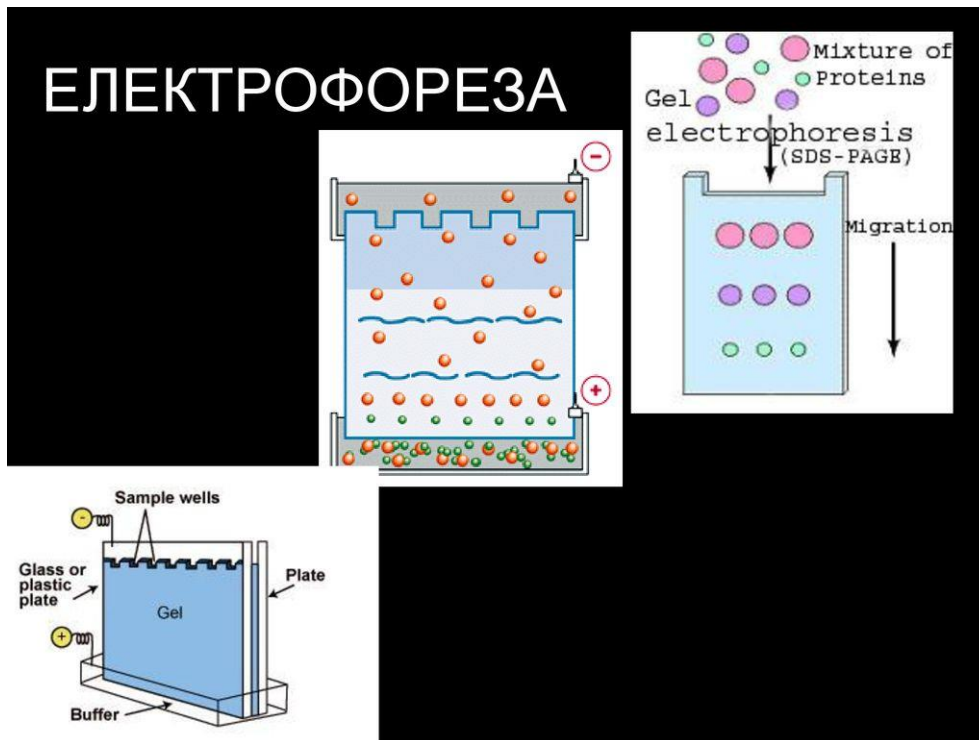
Основен принцип на електрофорезата е разделување на наелектризирани биомолекули под дејство на електрично поле.

Според, Тренковски С.,(2006) електрофореза во исто време претставува електрокинетичка појава, метода и процес. Под електрокинетичка појава се подразбира, движење на наелектризирани честички под дејство на електрично поле во насока на катодата или анодата низ соодветен раствор кој најчесто е слаб електролит. Од друга страна, се нарекува метода бидејќи може да служи

за раздвојување на протеини од смеса. Може да се нарече и процес бидејќи може да се менуваат услови под кои се работи за да се добијат целни резултати. Како краен резултат од електрофорезата е добивање електрофореграм.

Сличноста може да се направи со атомската спектрофотометрија, кога атомот е во ексцитирана состојба и во основна состојба дава посебна слика, па така кај електрофореза секој протеин (ДНК, ген и егзон) дава своја слика која може да се спореди со генетски отпечаток од прст. За разлика од електролиза, кај електрофореза не доаѓа до хемиска промена на самите електроди.

Според Дончевиќ,(2017) гел електрофореза е метод кој се користи за раздвојување макромолекули (на основа на нивна големина/облик и/или наелектризирање) во гел, низ кој се пропушта еднонасочна електрична струја. Електрофореза во агарозен гел овозможува раздвојување на фрагменти во граници од 0,1 – 50 бр, со што моќта на раздвојувањето зависи од големина на порите во гелот каде што има соодветна концентрација во агарозен гел. Електрофорезата се заснова на процес во кој стопена смеса или честичка со одреден полнеж, патува под дејство во електрично поле. Честичката патува во правец на една електрода, зависно од нејзиниот напон (позитивна честичка патува во правец на негативна електрода - анода, а негативна на кај позитивна електрода - катода). После завршување на електрофорезата, ДНК се отчитува со помош на одредени бои, најчесто се користени *етидијум бромид* (ексцитација на 302nm), а поретко со *SYBR green* (ексцитација на 365 nm).



Слика 2: Електрофореза – шематски приказ на разделување на молекулите

Figure 2. Electrophoresis – a schematic representation of the separation of molecules

1.4 ЗНАЧЕЊЕ НА ЕЛЕКТРОФОРЕЗАТА

Според Сретеновиќ (1985), електрофореза е многу моќна лабораториска метода и нејзините можности зависат (најмногу) од видот на материјалот кој се користи во анализата. Основната цел, со примената на самата метода да се дознае повеќе за физиолошки и метаболични процеси кои се поврзани со основните функции на организмот, како што се исхраната, здравствената состојба и генетика. Оваа метода служи за раздвојување на протеини, на молекулско ниво.

Според Тренковски (2006), наелектризираните честички можат да бидат колоидни честички, протеини, имуноглобулини, аминокисленини, нуклеотиди, гени и егзони.

Со оваа метода може да се детектираат промени во нуклеотидните секвенци на ДНК, а со тоа да се помогне во раната перинатална дијагностика и скрининг на одредени наследни заболувања.

Електрофорезата како метода е застапена во медицината, фармацијата, ветеринарство и во сточарство.

За да се отпочне со техниката на електрофорезата најпрвин потребен е примерок од телесни течности:

- крв,
- серум,
- плазма,
- урина,
- цереброспинална течност,
- хормони,
- изоензими,
- хидролизати на мускулот.



Слика 3: Примероци за електрофореза

Figure 3. Electrophoresis samples

1.5 ФАКТОРИ ОД КОИ ЗАВИСИ ЕЛЕКТРОФОРЕЗАТА

Со електрофорезата се движат наелектризирани честички кои можат да бидат позитивно или негативно наелектризирани. Најчесто станува збор за наелектризирани честички како што се: колоидни честички, протеини, имуноглобулини, аминокиселини, нуклеотиди, гени и егзони. Овие честички се движат со различна брзина низ медиумот низ кој поминуваат.

Брзината на движење на една наелектризирана честичка зависи од:

- **Електрицитетот на честичката (електричен полнеж),**
- **Големината,**
- **Обликот на наелектризираната честичка,**
- **Силата на електричното поле.**

Електрофорезата е резултат на електричниот отпор на гелот, со спроведување на соодветен електричен напон се воспоставува градиент на јачината на електрично поле, кој зависи од дебелината на гелниот слој. Заради воспоставениот градиент на јачината на електричното поле, фрагменти на ДНК со негативен полнеж поминуваат низ гелот кон позитивна електрода или катода. При тоа големите фрагменти патуваат поспоро, а помалите побрзо. Јачината на струјата се одредува во зависност од видот на електрофореза, а зависи и од видот на испитуваниот примерок. Некомпатибилноста на јачината на електричната струја оневозможува да се анализира примерокот или примерокот да се залепи на самиот раб на агарозниот гел. Во спротивно, при ниска јачина на струја и прекраток временски период при спроведување на електрофореза, примерокот недоволно се раздвојува од смесата при што нема да може да се детектира и испитува примерокот за анализа.

Исто така врз резултатите од електрофорезата влијаат:

- **Карактеристиките на самата средина,**
- **Температурата,**
- **Концентрацијата,**

Ако концентрацијата на агарозниот гел е голема, движењето на примерокот ќе биде отежнато.

- **Степенот на хидратација и дисоцијација на честичката,**
- **pH-вредност.**

Севкупниот полнеж на секој протеин е збир на сите позитивни и негативни полнежи од протеинските молекули. pH-вредноста при која вкупниот полнеж на протеинот е еднаков на нула, се нарекува изоелектрична точка (pI) момент кога честичките во полето не се движат. Во зависност од pH-вредноста, наелектризираната честичка (протеин) патува во една насока. Вообичаено, поконцентрираните пуфери имаат зголемен број на јони (поголема јонска јачина) и даваат поостри фракции. Бидејќи бројот на јони е зголемен и спроводливоста на системот е зголемена, (струјата исто така) па мора да се користи помал напон, во спротивно би настанало прегревање на средината и на примерокот што се користи за анализа. Како резултат на тоа, времето на одвојување е подолго отколку со пуфери со помала концентрација. Исто така врз ефикасноста на електрофорезата многу влијае:

- **Вискозноста и јонска јачина на пуферот,**
- **Јачината на електричната струја,**
- **Времето на патување на молекулата.**

Ако две електроди се поврзат со изворот на еднонасочна струја со одреден напон, помеѓу нив се создава електрично поле кое има моќ да дејствува со одредена сила на честичката, се со цел честичката да помине во ексцитирана состојба (наелектризирана).

Самата сила на покренување на честичката, условува честичката да која почне да се движи, спротивно на таа сила дејствува друга сила и во одреден момент се изедначуваат истите до одредена константна брзина.

Брзината зависи правопрпорционално од јачината на полето и наелектризираната честичка, а обратнопрпорционално од радиусот на честичката и вискозната средина, што значи брзината можеме да ја зголемиме ако ја зголемиме јачината на полето, односно напонот помеѓу електродите.

Токму наведените фактори влијаат на успехот на спроведената електрофореза, како и на конечните резултати. Неопходно е да се посвети внимание на видот на електрофорезата што се користи за анализа и на типот на анализираниот примерок. ДНК електрофорезата обично се одвива во полиакриламид гел или агарозен гел. За одвојување на мали фрагменти (до 500 бр) најчесто се користи полиакриламиден гел со големина на пора од 5-100 бр, а за одвојување на примероци со големи фрагменти се користи агарозен гел со молекуларна големина од 100-50.000 бр.



Слика 4: Гел електрофореза

Figure 4. Gel electrophoresis

1.6 ВИДОВИ НА ЕЛЕКТРОФОРЕЗА

Во зависност од тоа дали електрофорезата има носач или нема, се дели на: **слободна и зонска електрофореза.**

Во зависност од напонот се дели на **стандардна и високонапонска.**

Во зависност на начинот од поставените комори за електрофореза поделена е на **хоризонтална и вертикална.**

Во зависност во која димензија се работи може да биде **еднодимензионална** или **дводимензионална.**

Во зависност од принципот на работа се дели на: **изоелектрично фокусирање, денатурирачка електрофореза, неденатурирачка електрофореза, капиларна електрофореза.**

Во зависност од носачот електрофорезата се дели на: **електрофореза на филтер хартија, електрофореза на целулоза ацетат, електрофореза на агарозен гел, електрофореза на полиакриламиден гел.**

Нуклеинските киселини (ДНК и РНК) во поголем број случаи се анализираат со електрофореза во агарозен гел.

1.6.1 Слободна електрофореза

Слободната електрофореза се спроведува во чист пуферски состав во цевка во форма на буква U. Цевката од едниот крај се спојува со анода, а со другиот крај со катода каде што честичките патуваат со различна брзина од една до друга електрода.

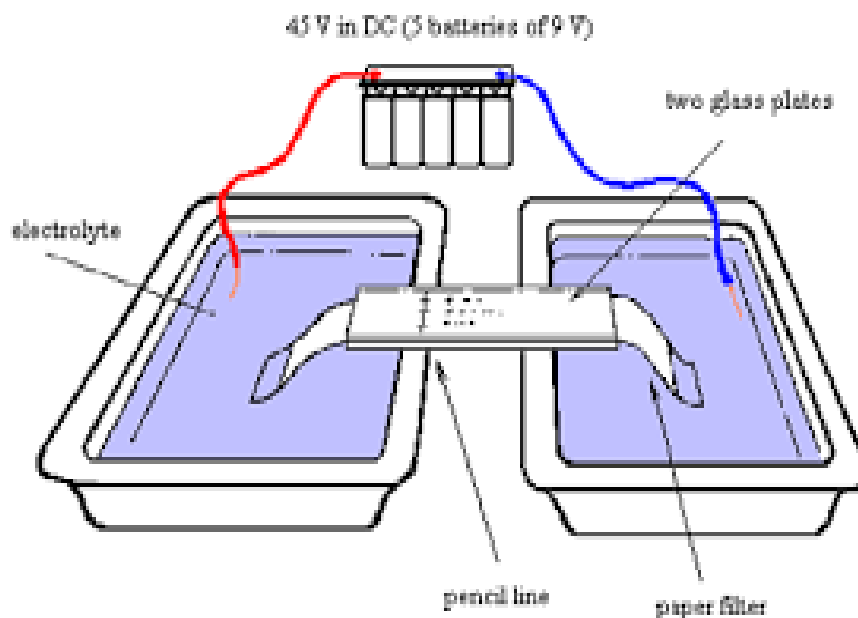
Ова техника најчесто се користи за одвојување на протеини.

1.6.2 Зонска електрофореза

Зонската електрофореза се спроведува во внатрешноста на чисти електрофоретски носачи, во кои примерокот со процесот на одвојување е изолиран во поединечна зона. Носачот се наоѓа во електрофоретска кадичка, има два пуферски одделувача кои се споени со електродите, анода и катода.

1.6.2.1 Електрофореза со филтер хартија

Електрофорезата со филтер хартија дава релативно лоши резултати заради лоша градба и нееднаква големина на порите на филтерската хартија. Стационарна фаза е самата филтер хартија на која се наносува материјалот за анализа или примерокот. Таа се одвива многу брзо и е една од поекономичните електрофоретски техники кои се употребуваат.



Слика 5: Електрофореза со филтер хартија

Figure 5. Electrophoresis with filter paper

1.6.2.2 Електрофореза на целулоза ацетат (CAGE)

Електрофореза на целулоза ацетат (CAGE) се користи како замена за електрофореза на хартија и со неа се анализираат протеините во серумот. Стационарната фаза има мазна површина и порите имаат соодветни големини, заради тоа протокот на наелектризираните честички низ електрофоретски носач се одвива полесно и правилно.

1.6.2.3 Електрофореза на скробен гел

Електрофореза на скробен гел е метода на раздвојување на макромолекуларни јони на основа на површинскиот полнеж и големината на молекулите.

Успешноста на електрофорезата зависи од квалитетот на скробниот гел.

1.6.2.4 Електрофореза на агар гел (AGE)

Електрофореза на агар гел (AGE) дава резултати слични на електрофореза на ацетатна целулоза, смесата на гелот е составена од агаропектин и агароза, која придонесува до појава на електроендоосмоза.

1.6.2.5 Електрофореза на полиакриламиден гел (PAGE)

Електрофореза на полиакриламиден гел (PAGE) е метода која не се применува за раздвојување на примероци со големи молекули туку се користи за раздвојување молекули со слична густина на полнежот.

1.6.2.6 Електрофореза во агарозен гел (SDS PAGE)

Голем број на пори во агарозниот гел, се доволно големи да овозможуваат слободно минување на големите молекули од примерокот низ гелот кој се користи. Наелектризираните честички се одвојуваат или раздвојуваат во зависност од густината на полнежот.

Гел електрофореза е најзастапена и е тип електрофореза во која молекулите се одделуваат со движење преку порозен гел под влијание на електричното поле. Гелот е составен од агароза и полиакриламид. Електрофорезата на агарозен гел најчесто се користи за одделување на нуклеинските киселини (ДНК и РНК), фрагменти на нуклеинска киселина и протеини.

1.6.2.7 Имуноелектрофореза

Имуноелектрофореза е општото име дадено на различни електрофоретски техники кои се користат за карактеризирање и одделување на протеините врз основа на нивната реакција на антитела.

1.6.2.8 Капиларна електрофореза

Капиларна електрофореза е тип на електрофореза што се користи за одвојување на јони во зависност од атомскиот радиус, полнежот и вискозитетот. Како што кажува името, оваа техника најчесто се изведува во стаклена туба и дава брзи резултати, а се постигнува сепарација со висока резолуција.

1.6.3 ДНК – гел електрофореза

За испитување на ДНК се применува електрофореза која се изведува на две различни површини во зависност од материјалот и од очекуваниот резултат. Најчесто се користат следните електрофорези:

1.6.3.1 Полиакриламидна гел електрофореза (ПАГЕ)

ПАГЕ се употребува за анализа на помали фрагменти. Најчесто употребуван е 6% полиакриламиден гел. Најчесто полиакриламидот (мономерна форма) се чува како 40% шток раствор кој е помешан со бисакриламид во однос 19:1.

🚦 *Предности на ПАГЕ се:*

- ✓ Ги раздвојува молекулите кои должински се разликуваат за 0,2%,
- ✓ Можат да се раздвојат многу мали фрагменти,
- ✓ Можат да се раздвојат големи количини од ДНК без да се изгуби во резолуција,
- ✓ Изолатите на ДНК кои се добиваат од полиакриламидниот гел се неконтаминирани и спремни за употреба во понатамошни техники на работа.

➤ *Недостатоци на ПАГЕ:*

- ✓ Тежок начин на подготовка и работа со ваков вид на гел,
- ✓ Мономерната форма е невротоксична.

1.6.3.2 Агарозна гел електрофореза

Агарозата е материјал на избор при работа со големи фрагменти на ДНК. Со внимателен избор на концентрација на гелот кој се користи за анализа, се овозможува оптимално раздвојување на саканите фрагменти од ДНК.

✚ Предности на агарозата се:

- ✓ Не е токсична,
- ✓ Геловите се цврсти и со нив може да се работи и во хоризонтална положба со што може да се следи целата постапка во секој момент на нејзиното траење,
- ✓ Не содржат инхибитори.



Слика 6: Агароза

Figure 6. Agarose

Најчесто употребувана подлога при ДНК електрофорезата е агарозата, заради многубројните предности кои ги има во изведување на истата. Најважните апликации вклучуваат ДНК анализа во форма на фрагменти и ДНК секвенционирање врз основа на можноста да се одделат молекули со различна големина (едни во однос на други). За да се потврдат измерените вредности се користи специјализиран софтвер за проценка на фрагментација и секвенционирање (на пример, ширини, моларни маси, квантификации или нормализирање). Графиконот на резултатите е електроферограм.

Електрофорезата, исто така, претставува основа за раздвојување на протеините и за високотехнолошките процеси на истражување на протеомите.

2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Главна цел на овој специјалистички труд е:

- да се направи преглед на развојот и усовршувањето на електрофорезата како метода,
- детално да се објасни принципот на работа и изведувањето на методата,
- да се објаснат сите видови на електрофореза со посебен осврт на ДНК - гел електрофорезата,
- да се направи споредба помеѓу нив и да се утврдат нивните предности и недостатоци,
- да се потенцира улогата на лаборантот во изведување на неа и валидација на резултатите.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ТРУДОТ

1. Детално ќе биде објаснета целата постапка и процедура на ДНК - гел електрофорезата.
2. Посебно ќе биде објаснета улогата на лаборантот во самата аналитичка процедура.
3. Ќе биде направен литературен преглед на примената на ДНК - гел електрофорезата, посебно во делот на медицинската лабораториска дијагностика.

3.1 Изведување на ДНК - гел електрофореза

Молекулите на ДНК во неутрални и слабо алкални раствори вообичаено имаат приближно еднаков електричен полнеж. Од таа причина за нивно раздвојување се користат молекулски сита каде меѓусебно молекулите на ДНК се раздвојуваат врз основа на големината и обликот на молекулите.

Се користат молекулски сита од **агарозен гел** за раздвојување на ДНК со голема молекулска маса и *полиакриламиден гел* за раздвојување на мали молекули во примерокот. Агарозен гел во електрофоретски методи најчесто се користи за анализа и прочистување на ДНК – неговите фрагменти со големина 1 000 – 23 000 bp.

За да се започне со самата техника на електрофореза потребен е соодветен материјал, опрема, инструменти и апарати за детекција на молекулските фрагменти од ДНК во агарозен гел.

➡ Потребен материјал за агарозната гел електрофореза:

- ✓ Апарат за макро електрофореза (исправувач на струја, големи кадички, чешли).
- ✓ Примерок на ДНК.
- ✓ ДНК скала (ладер). Според Спироски М. и сор.(2012) тоа е смеса од ДНК фрагменти (околу 10-20) со позната големина. Големината на ДНК фрагменти кои се раздвојуваат со помош на електрофорезата се одредува преку споредба на нивната релативна позиција со позицијата на траките добиени од ДНК скалата (ладерот).
- ✓ Пуфер (1 x TAE (трис-ацетат – ЕДТА) со Рн = 8,5).
- ✓ Агароза.
- ✓ Етидиум бромид.
- ✓ Обоен обележувач кој содржи нискомолекуларна боја, како на пр. бромфенол сино (за да овозможи следењето на процесот на

электрофореза) и глицерол (за да ја зголеми густината на примерокот на ДНК, за да би овозможило негово задржување на местото на внесување).

- ✓ Ерленмаер од 500 ml.
- ✓ Мензура од 500 ml.
- ✓ Чаши од 1 l.
- ✓ Колби од 1 l.
- ✓ Латекс ракавици за еднократна употреба.
- ✓ Микропипети.
- ✓ Пластични продолжетоци.
- ✓ Ултравioletен осветлувач.
- ✓ Голема комора.
- ✓ Полароид филмови.

3.1.1 Подготовка на TAE пуфер

✓ Подготовка на 1 x TAE

Според Спироски М. и сор. (2012) пуферот се подготвува на следен начин: во стаклена мензура се мерат 40 ml 50 x TAE и се префрлаат во стаклена колба од 2 l. Се дополнува до 2 l со дестилирана вода.

3.1.2 Подготовка на 2% гел за електрофореза

✓ Подготовка на носачот на гел

Носачот на гел и од двете страни се затвора со самолеплива лента.

После тоа, на однапред означени места се ставаат 4 чешли.

✓ **Подготовка на гелот**

Се мерат 5,5 g агароза и се префрлаат во ерленмаер од 500 ml. Во ерленмаерот се додава 275 ml 1 x TAE.

Ерленмаерот се загрева сè додека гелот не се избистри.

При загревање, растворот се промешува и се проверува дали се растопени сите кристали на агароза, доколку не се, се продолжува со постапката се до нивно крајно растопување. Доколку останат нерастопени тие ќе пречат во одвојувањето на молекулите во самата постапка на електрофореза. Постапката не завршува се додека растворот не почне да врие.

После тоа, за да не дојде до испарување на растворот, отворот на тиквичката се поклопува со Претриева шолја.

Гелот се лади до приближно 60°C со постојано мешање.

Се додава 30µl етидиум бромид и се промешува, при што е неопходно носење на ракавици за еднократна употреба.

Во денешно време се употребува флуоресцентна боја 3µL SYBER Safe / GREEN (кој го има заменето етидиум бромид кој има докажано мутагени и канцерогени својства). Оваа боја ќе го обои растворот во светла портокалова боја или во зелена боја.

Оладениот (до приближно 60°C) гел се истура на рамна површина за да се добие рамномерно распореден агарозен гел, по кој ќе се движат примероците во претходно припремениот носач на гелови.

Откога гелот потполно ќе се олади, ќе почне да се стврднува.

На текот и резултатите од агарозната електрофореза влијае и својството на агарозниот гел, односно дебелината и неговата концентрација. При ДНК електрофорезата најчесто се применува агарозен гел со дебелина на слој од 1 до 10 mm.

✓ Гел електрофореза

Непосредно пред да заврши циклирањето, се вади самолепливата лента и носачот заедно со гелот се префрла во апаратот за електрофореза, за да се овозможи стабилизирање на системот. Пуферот треба комплетно да го прекрива гелот. Дупчињата каде што треба да се аплицираат примероците, треба да се поблиску до негативната електрода.

По 9 μ l од секое бунарче се префрла во соодветно бунарче на гелот. Во едно бунарче се аплицира ДНК скала (ладер).

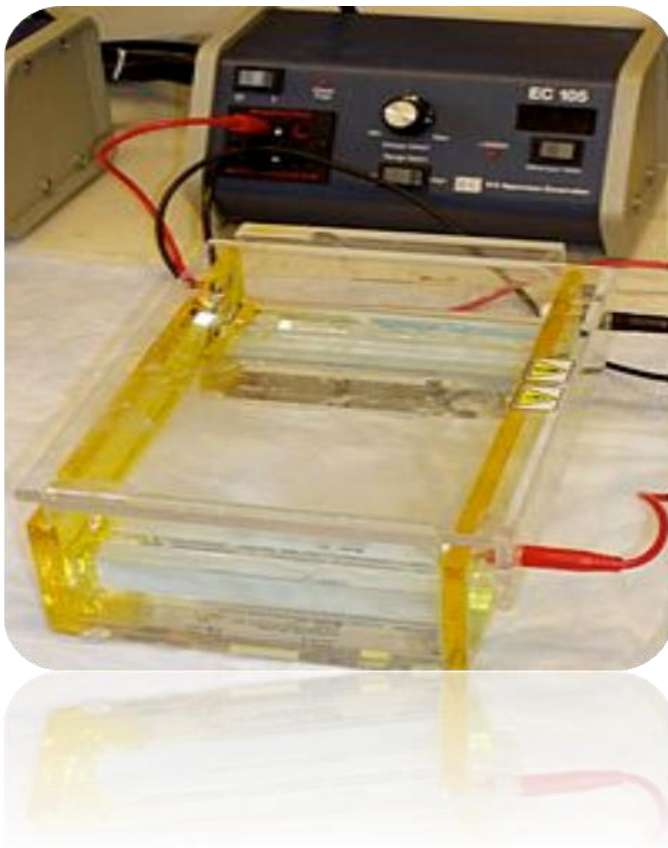


Слика 7: Нанесување на примерокот

Figure 7. Application of the sample

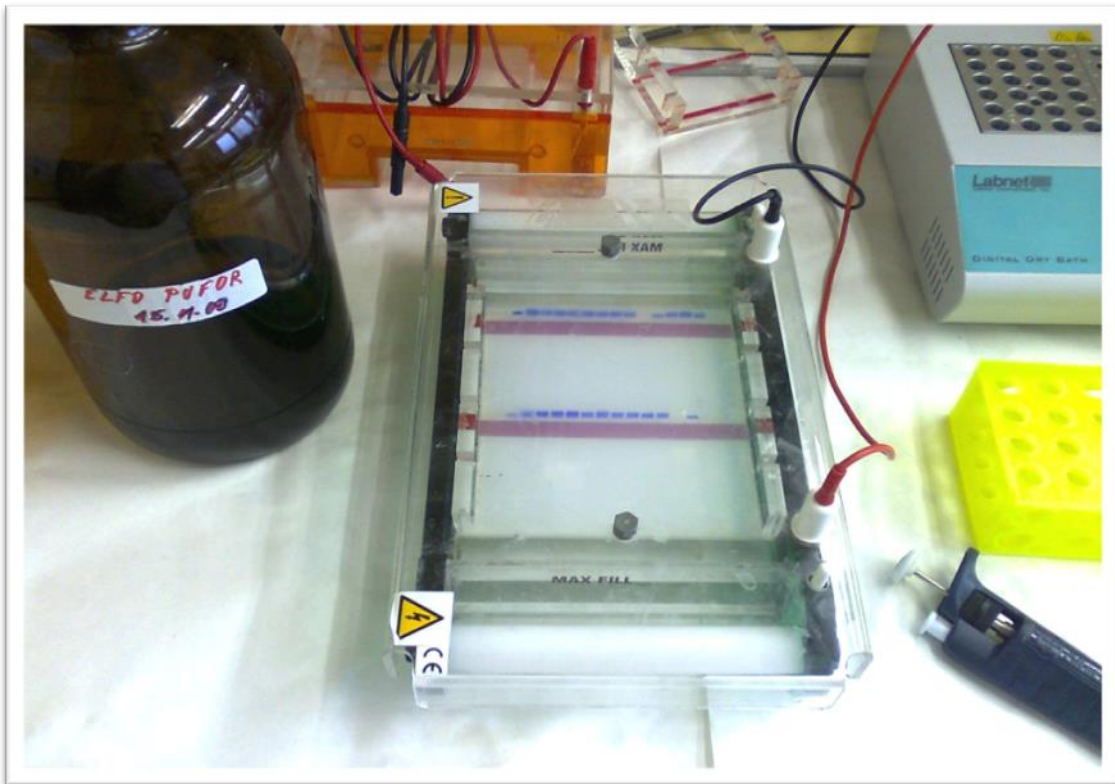
Откога ќе се аплицираат сите примероци во гелот, се затвора апаратот за електрофореза и се пушта електрофорезата која трае 25 min. Откако лаборантот ги има нанесено примероците, уредот за електрофореза се затвора и се спојува со протокот на струја CONSTOR при 130 KW. Уредот се поврзува со протокот на струја, така што нанесените примероци да се на страна на анодата, а негативно

наелектризираните молекули да се движат по агарозниот гел кон катодата. Ако во пуферскиот раствор се развијат меурчиња на анодата и катодата, тогаш електрофорезата е успешно започната. После истекот на времето на електрофорезата потребно е лаборантот да го прекине изворот на струјата и да се исклучи уредот CONSTOR и да се одвои од садот во кој се наоѓаат примероците. Агарозниот гел внимателно се вади од кадичката и се префрла во уред за детекција.



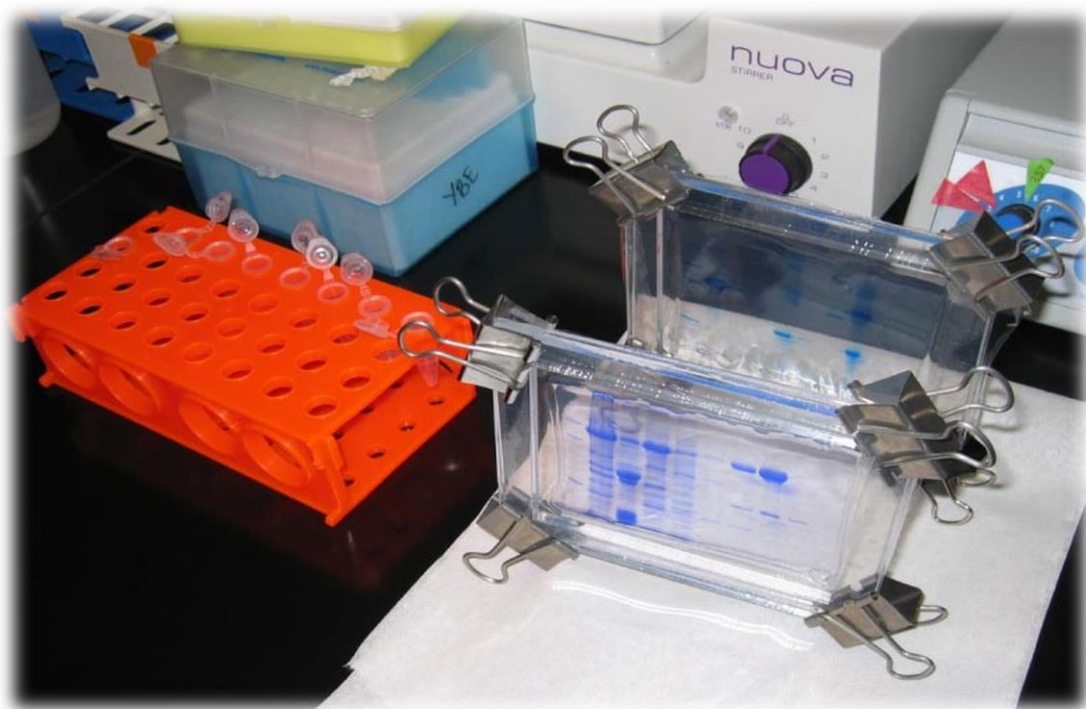
Слика 8: Уредот за гел електрофореза

Figure 8. The gel electrophoresis apparatus



Слика 8: Хоризонтална електрофореза

Figure 8. Horizontal electrophoresis



Слика 9: Вадење на плочите

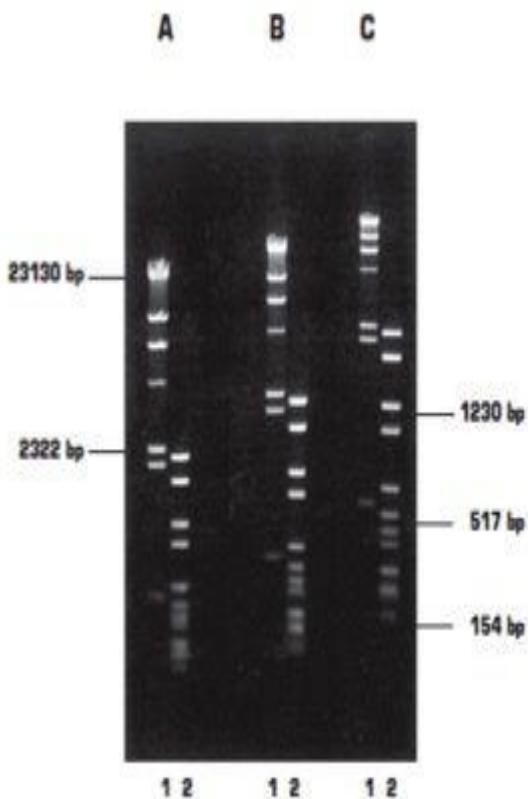
Figure 9. Removing the plates

✓ **Фотографирање на гел електрофорезата**

По завршената електрофореза, гелот во кој има етидиум бромид се осветлува на ултравиолетно светло и се фотографира со полароид камера. Со фотографирање на добиените резултати од електрофореза на агарозниот гел се добива фотографија на која се видливи бунарчињата во кои се нанесени примероците кои се сочувани во траен запис tiff и jpg формат. Соодветен ДНК маркер се распоредува по должина на агарозниот гел во облик на испрекината цртичка. Секоја цртичка на маркерот означува точно одреден квантитет и големина на ДНК фрагменти, истите се споредуваат со зададениот испитуван фрагмент на ДНК со што се одредува големината на примерокот.

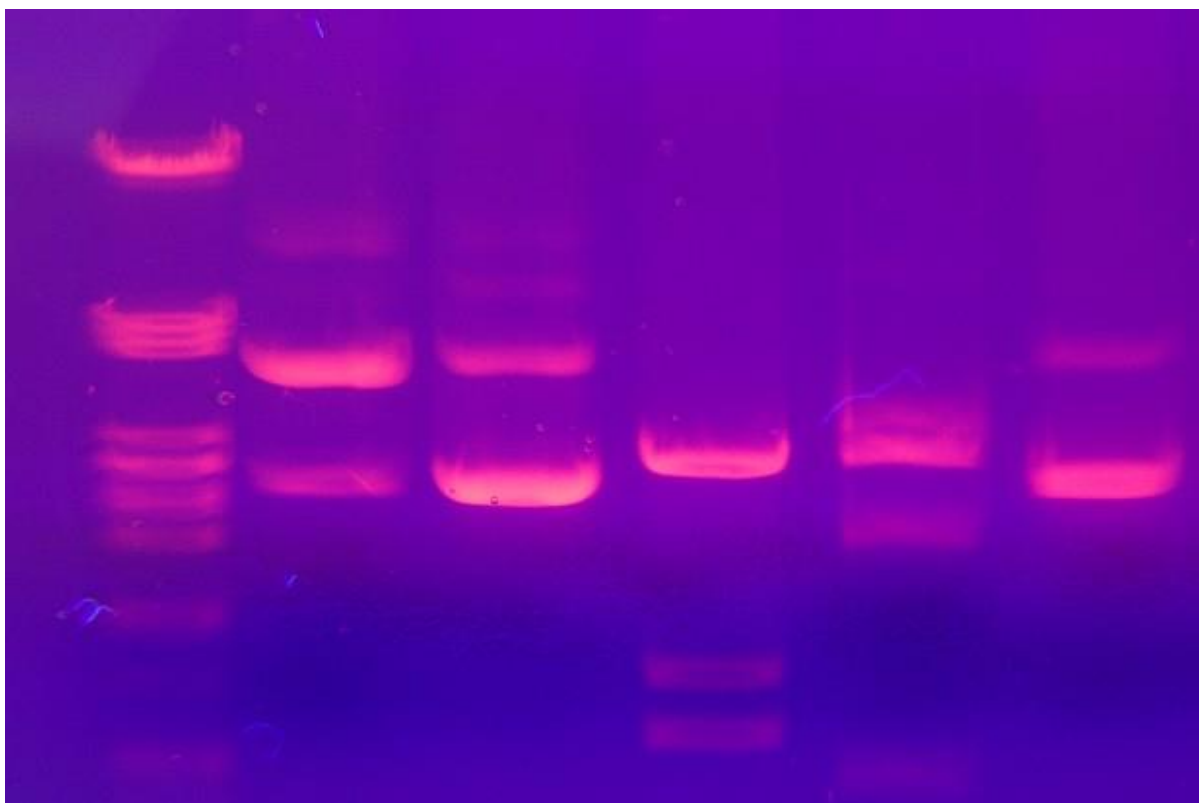
ДНК изолат се состои од само еден вид на фрагменти на ДНК, а со тоа електрофорезата дава само една јасна црта под дејство на UV зраци.

Се користат ДНК стандарди кои се специфични, со точна одредена големина на ДНК сегменти кои се користат за одредување на големината на добиените непознати и познати примероци. Резултатите од фотографијата се сечат и се лепат.



Слика 10: а) Добиени резултати од ДНК - гел електрофорезата

Figure 10 a). DNA gel electrophoresis results obtained



Слика 10: б) Добиени резултати од ДНК - гел електрофорезата

Figure 10 b). DNA gel electrophoresis results obtained

3.2 Улогата на лаборантот во ДНК - гел електрофореза

При спроведувањето на самата техника на ДНК - гел електрофореза важна улога зазема лаборантот како стручен и оспособен здравствен работник.

Тој внимателно и одговорно ја спроведува и изведува целата постапката од анализата, во прилог на добивање на точни, прецизни и веродостојни резултати.

За да се заштити себеси и да не дојде до излевање на содржината или примерокот за анализа, вообичаено како и при секоја друга лабораториска постапка и процедура треба да носи:

- медицинска облека (мантил, капа, очила),
- латекс ракавици за еднократна употреба.

Посебно пред да започне со постапката треба да внимава на:

- рокот на реагенсите кои ги користи,
- концентрација на реагенсите,
- количината на реагенсите,
- точно обележени реагенси,
- исправноста на апаратурата (нејзино вклучување и исклучување),
- да не е контаминиран примерокот за анализа (ДНК),
- точно земен примерок од соодветно лице (пациент) за кое се испитува,
- чување на примерокот на соодветна температура,
- точно евидентирање на резултати на лице (пациент) кое се испитува,
- одржување на чиста и проветрена просторија.



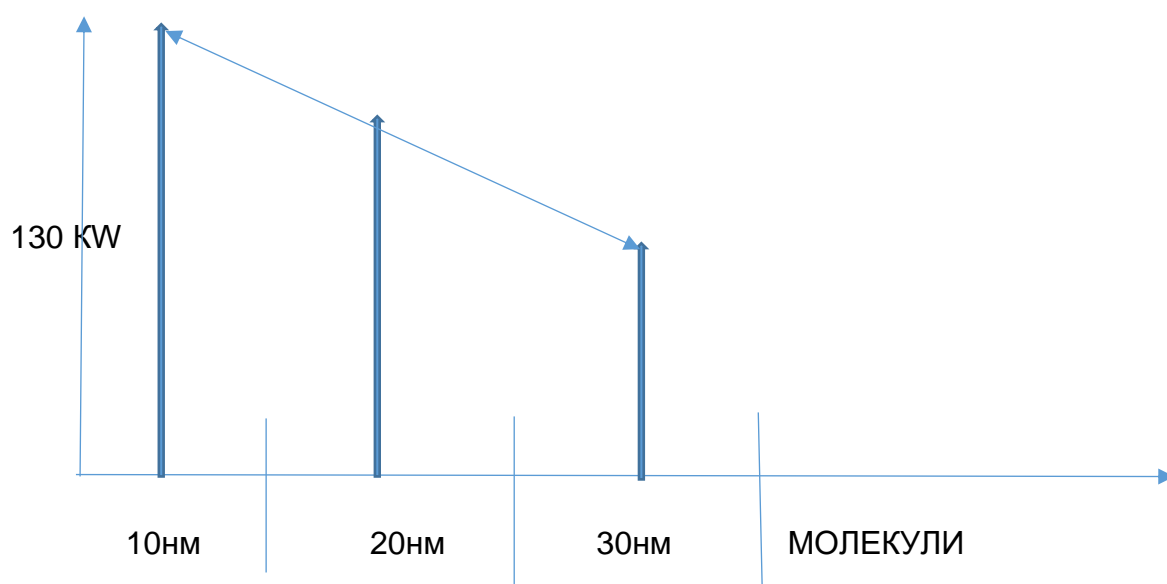
Слика 11: Лаборант во медицинска облека

Figure 11. Laboratory technician in medical clothing

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Спроведување на различни видови на електрофорези, доведуваат до добивање на различни резултати, односно различни заклучоци.

Сите тие имаат свои предности и недостатоци. Најчесто се спроведуваат оние техники или видови на електрофорези кои имаат повеќе предности заради добивање на најбрзи, најверодостојни т.е. валидни резултати. Посебно е важно читањето и прикажувањето на резултатите од анализата.



Гел електрофорезата е техника која се користи за одвојување на фрагменти на ДНК со користење на електрична струја (фрагментите на ДНК кои се негативно наелектризирани - се движат кон позитивната електрода). Малите фрагменти се движат низ гелот побрзо од големите. Самите фрагменти на ДНК можат да се видат како ленти, од кои секоја претставува група со различна големина.

Според, Ненсо К. и сор., (1994) температурниот градиент на гел електрофорезата е многу важен фактор за детекција на полиморфизмот на ДНК и РНК. Температурноградиент гел електрофореза (TGGE) се применува за да се анализираат конформациските транзиции и секвенциските варијации на

нуклеинските киселини и интеракциите протеин - нуклеинска киселина. Линеарен и високорепродуктивен температурен градиент е воспоставен нормално или паралелно на насоката на електрофорезата. Инструментот се состои од електрично изолирана метална плоча, која се загрева на едниот раб, а на другиот раб се лади со две термостатирани бањи и се користи како помошен уред за комерцијални инструменти за хоризонтална електрофореза на гел. Биополимерите се одвојуваат во TGGE според големината, обликот и топлинската стабилност на нивните конформациски транзиции. Ако температурниот градиент е воспоставен нормално на електрофорезата, мономолекуларните конформациски транзиции на нуклеинските киселини се појавуваат како криви на континуирана транзиција; раздвојувањето на жиците доведува до прекини и транзиции. Резултатите се дискутирани под аспект дека TGGE може да се примени како рутинска аналитичка лабораториска процедура.

Според, Беркес (Berkes) (1951), електрофорезата се користи во фармацевтската индустрија, како контролен метод за тестирање на чистотата на препаратите за време на производство и добивање на хормонски препарати (инсулин), аминокиселина (хистидин), при изолација на изоензими, во броматологија (албумин, протеини на млеко и житарки) итн.

Според Калименновска (Kalimanovska), (1989), со примена на ДНК електрофорезата се потврдуваат генетски варијанти на изоензими во хумана популација.

Стоилковиќ (Stoiljkovic), (1992), потврдува дека ДНК - гел електрофорезата е посебно апликативна за скрининг на генетскиот полиморфизам на алфа - 1 антитрипсинсинскиот инхибитор и истиот се поврзува со појавата на емфизем во белите дробови.

Според Özlem S. и сор. (2020), ДНК електрофорезата има посебна важност во делот на раната медицинска дијагностика и третман на голем број заболувања, посебно кога станува збор за ретки болести.

Заклучок (Concluding remarks)

Со овој специјалистички труд сакаме да ја потенцираме важноста и значењето на ДНК - гел електрофорезата и нејзината примена во различни области од медицината кои се базираат на истражување на хуманиот геном, наследувањето на одредени болести и здравјето воопшто.

Истите овозможуваат истражување на одредени гени, рано откривање и дијагностицирање на голем број болести, нивна превенција и третман.

Како техника е посебно користена и употребувана во имунохемиски, биохемиски, генетски и микробиолошки лаборатории.

Познавајќи ги теоретските принципи, основи и значење на ДНК - гел електрофорезата, лаборантите ќе можат неа да ја применуваат и во пракса, а во прилог на современа медицинска лабораториска дијагностика.

Користена литература (References)

Basım, E. And Basım, H., (2001). Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and its Use in Molecular Biology. Turkish Journal of Biology, 25(4):405-418.

Bosnjakovski, D. Molekularna biologija so genetika, UGD, 2018

Henco K, Harders J, Wiese U, Riesner D. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for the detection of polymorphic DNA and RNA. Methods Mol Biol. 1994;31:211- 28. doi: 10.1385/0-89603-258-2:211. PMID: 7522829.

Ivan Piljac; Elektroforeza, Sveučilište u zagrebu, Zagreb, 2015

Khan Academy. Gel electrophoresis- A technique used to separate DNA fragments and other macromolecules by size and charge.
<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>

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

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp. 2012 Apr 20;(62):3923. doi: 10.3791/3923. PMID: 22546956; PMCID: PMC4846332.

Lojo-Kadrić, Naida. Laboratorijske tehnologije u molekularnoj biologiji / Naida LojoKadrić, Naris Pojskić, Lejla Pojskić. - Sarajevo : Institut za genetičko inženjerstvo I biotehnologiju, 2018.

Moore D, Chory J, Ribaud RK. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 10:Unit 10.5. doi: 10.1002/0471142735.im1005s08. PMID: 18432696.

Mukh Syaifudin, Gel electrophoresis: The applications and its improvement with nuclear technology. *AIP Conference Proceedings* 2331, 050008 (2021); <https://doi.org/10.1063/5.0042067>

Nedelcu, S. and Watson, J.H.P., (2004). Size Separation of DNA Molecules by Pulsed Electric Field Dielectrophoresis. *J. Phys.D: Appl. Phys.*, 37:2197–2204.

Ordovas JM. Separation of small-size DNA fragments using agarose gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 1998;110:35-42. doi: 10.1385/1-59259-582-0:35. PMID: 9918037.

Özlem Coşkun, Özlem Öztöpus. Electrophoresis applications used in medicine. *Journal of New World Sciences Academy* 15(1):12-25, 2020

Petersen, J.R., Okorodudu, A.O., Mohammad, A., and Payne, D.A., (2003). Capillary Electrophoresis and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chim Acta.*, 330:1-30.

Pagaduan, J.V., Sahore, V., and Woolley, A.T., (2015). Applications of Microfluidics and Microchip Electrophoresis for Potential Clinical Biomarker Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(23):6911-6922.

Spiroski, M. *Genetika*, Institut za imunobiologija I genetika, 2012

Svetlana Makovets, *DNA electrophoresis: methods and protocols*, Humana press, New Jersey, 2013

Tissot, J.D., Layer, A., Schneider, P., Forestier, F., and Henry, H., (2000). *Gel Electrophoresis*

Ugaz, V.M., Lin, R., Srivastava, N., and Burke, D.T., (2003). Burns M.A. A Versatile Microfabricated Platform for Electrophoresis of Double and Single Stranded DNA. *Electrophoresis.*, 24:151-7.

Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 10:Unit 10.4. doi: 10.1002/0471142735.im1004s02. PMID: 18432695.

Wang X, Sawaguchi T, Sawaguchi A. Application of electrophoresis technology to DNA analysis. *Electrophoresis*. 2000 Jan;21(2):334-7.

Рецензирани и објавени трудови од истражувањето

Ѓорѓевска, М¹., Величкова, Н²., Основни принципи, значење и примена на ДНК – гел електрофорезата, Зборник на резимеа, 49-ти Октомврски средби, Охрид 06.10-09.10.2022

Марија Ѓорѓевска
Основни принципи, значење и примена на ДНК – гел
електрофорезата
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип