

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA**

# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

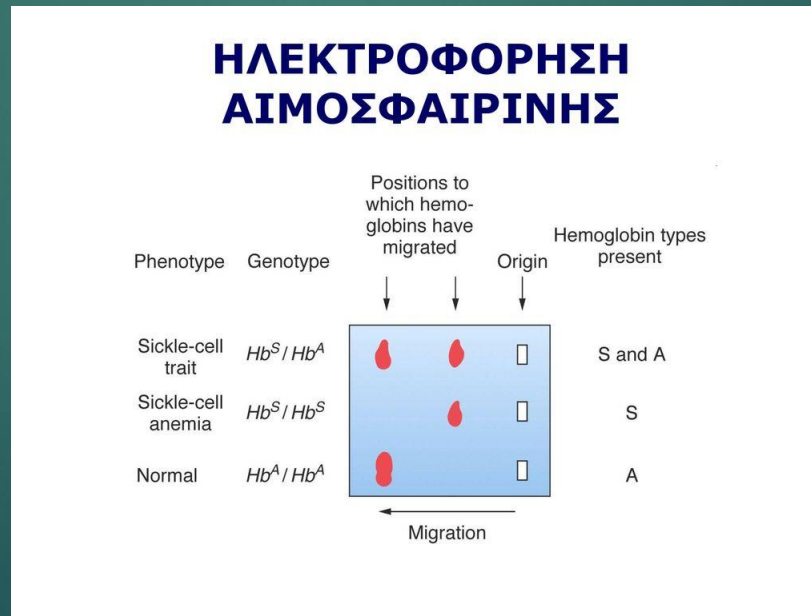
- ▶ Αναλυτική μέθοδος που βασίζεται στη μετακίνηση φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου

- ▶ **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

- Στο διαχωρισμό μακρομορίων, π.χ.: πρωτεϊνών, DNA, RNA, αμινοξέων και φαρμακευτικών ουσιών
- Στον έλεγχο της καθαρότητας δείγματος
- Στον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο
- Στον προσδιορισμό μοριακού βάρους

# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

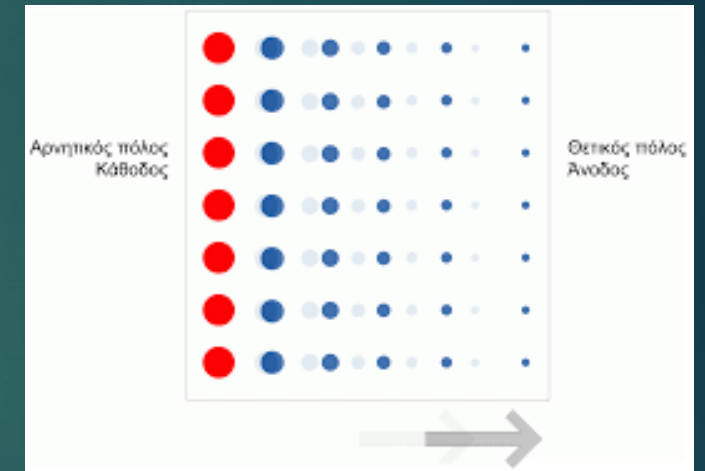
Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ευρέως στο κλινικό εργαστήριο και αποτελεί πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο στις βιοιατρικές επιστήμες



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

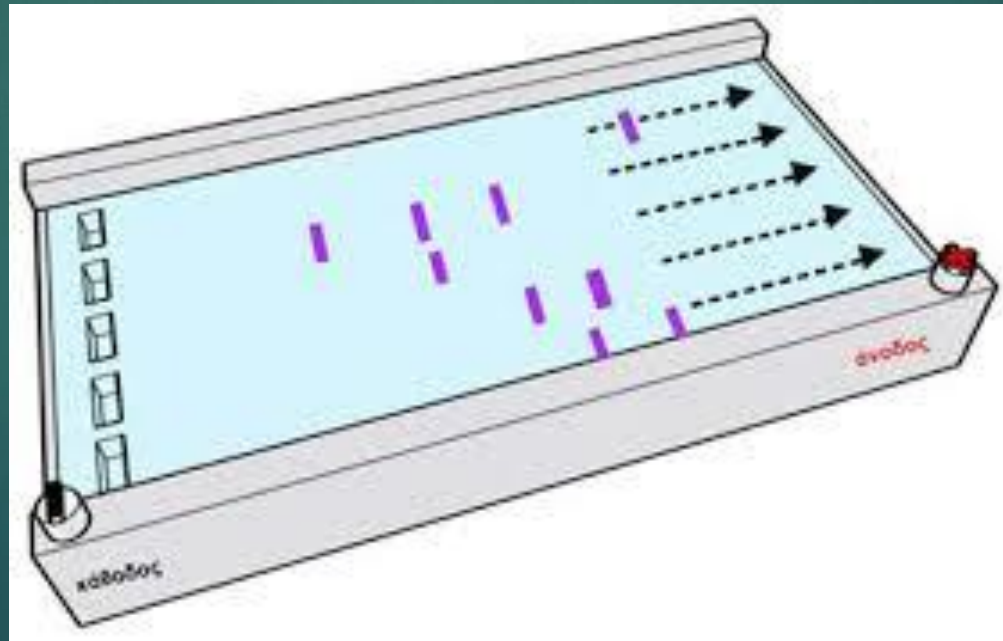
## ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- ▶ Στηρίζεται στην αρχή της κίνησης φορτισμένων σωματιδίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.
- ▶ Μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τον ένα ή τον άλλο πόλο με **ταχύτητες διαφορετικές**, ανάλογα με το **φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους**
- ▶ Ο ρυθμός μετακίνησης εξαρτάται και από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως η διαμόρφωση του μορίου, η θερμοκρασία, το είδος του χρησιμοποιούμενου μέσου, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος και το μέγεθος της εφαρμοζόμενης τάσης.



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πήκτωμα ή χαρτί), πάνω στο οποίο έχει τοποθετηθεί σε ένα σημείο το προς ανάλυση δείγμα. Σε μια τέτοια διάταξη τα θετικά φορτισμένα ιόντα (κατιόντα) θα προχωρήσουν προς τον αρνητικό πόλο (κάθοδο), ενώ τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα (ανιόντα) προς τον θετικό πόλο (άνοδο).



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Στον πιο διαδεδομένο τύπο ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται ένα πήκτωμα (gel) αποτελούμενο από κάποιο πολυμερές, π.χ. έναν πολυσακχαρίτη (αγαρόζη, άμυλο ή πολυακρυλαμίδιο).

Το πήκτωμα λειτουργεί ως ένας μοριακός ηθμός ο οποίος διαχωρίζει νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος, το ηλεκτρικό φορτίο και άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων.

Κατά τον διαχωρισμό τους τα μακρομόρια διατάσσονται υπό μορφή ζωνών μέσα στο πήκτωμα, γι' αυτό και η τεχνική συχνά αναφέρεται ως **ηλεκτροφόρηση ζώνης σε πήκτωμα**.

Σε έναν άλλο τύπο ηλεκτροφόρησης, τα μακρομόρια διαχωρίζονται με βάση την ίδια σχέση, η όλη διαδικασία όμως γίνεται σε αδρανή υλικά, όπως χαρτί ή οξική κυτταρίνη (ηλεκτροφόρηση ζώνης σε χαρτί).



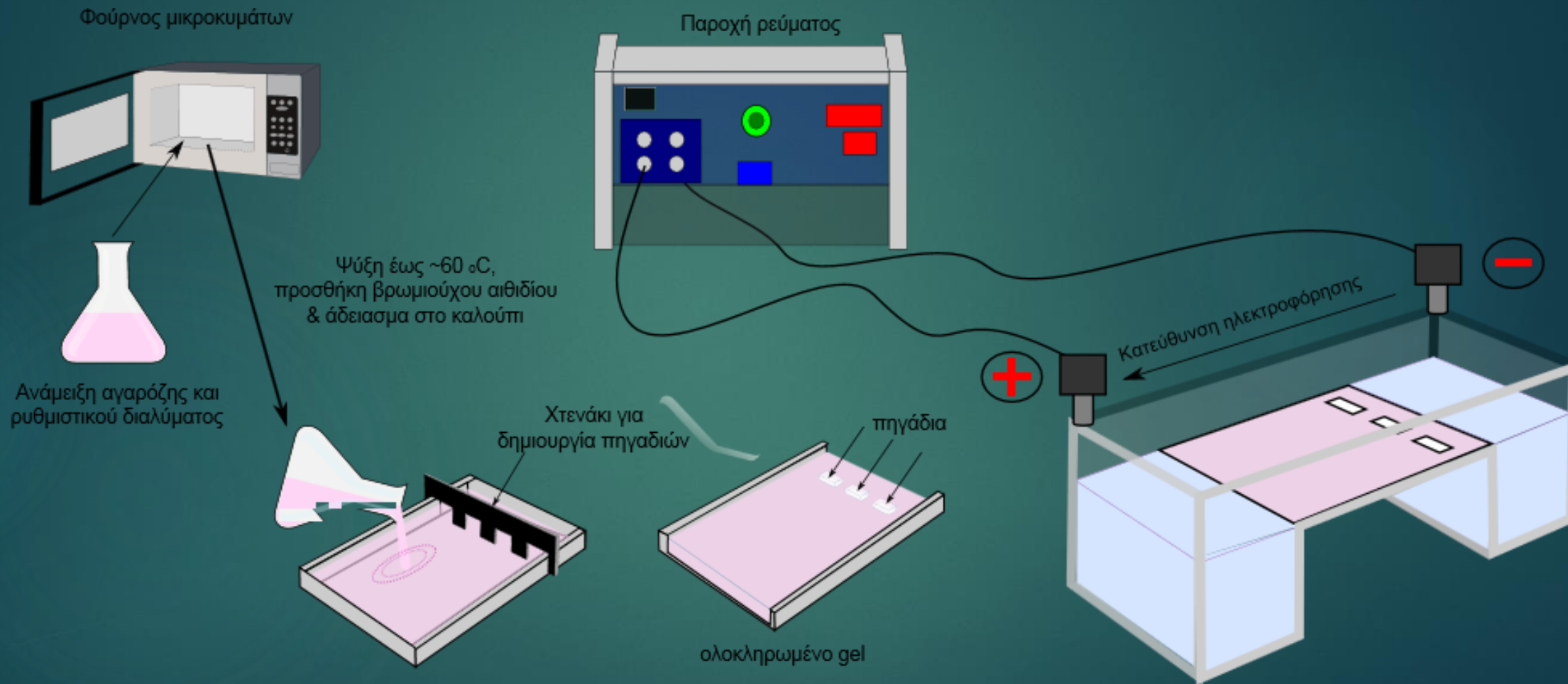
# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA  
**Απλή, γρήγορη στην εφαρμογή και αρκετά ευαίσθητη**

**Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια :**

1. Παρασκευή **πηκτώματος αγαρόζης**, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.
2. **Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής** τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης **ηλεκτρικής τάσης** στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA.
3. **Χρώση** του πηκτώματος (αν αυτή δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο παρασκευής του) με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA και στη συνέχεια άμεση παρατήρηση και φωτογράφησή του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας

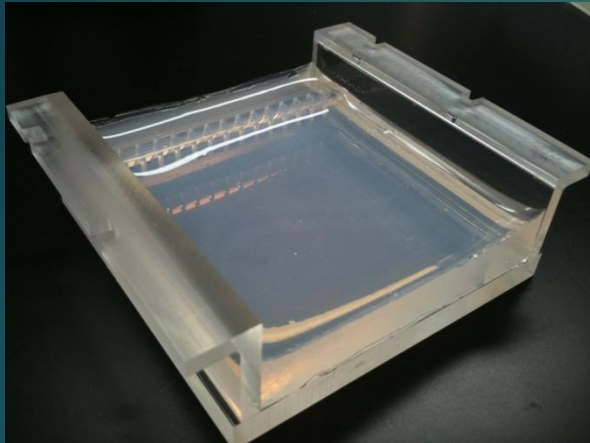
# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ



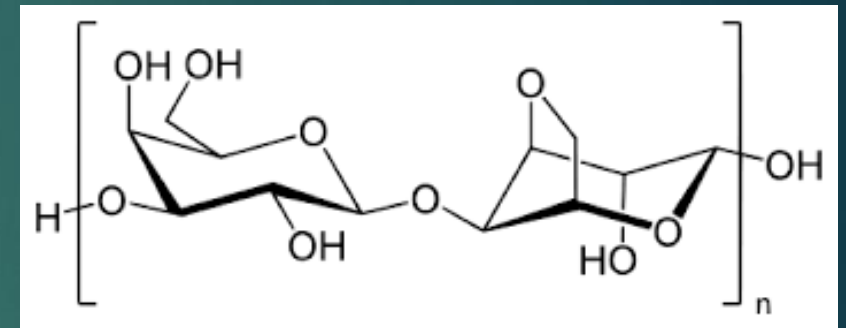


# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

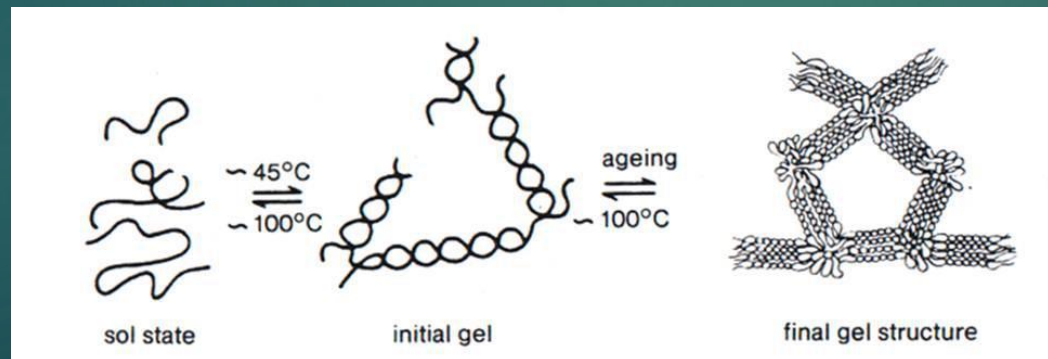
Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές (D-galactose και 3,6 anhydrogalactose) που βρίσκεται στο άγαρ το οποίο απομονώνεται από φύκη (red algae).



Το ουδέτερο φορτίο καθώς και η χαμηλού βαθμού χημική πολυπλοκότητα της αγαρόζης την κάνουν ένα πολύ καλό υλικό ηλεκτροφόρησης καθώς δεν αλληλεπιδρά με τα υπό ανάλυση βιομόρια



Κατά τη ψύξη δημιουργούνται δεσμοί H και οδηγούν στη δημιουργία πηκτής (gel)

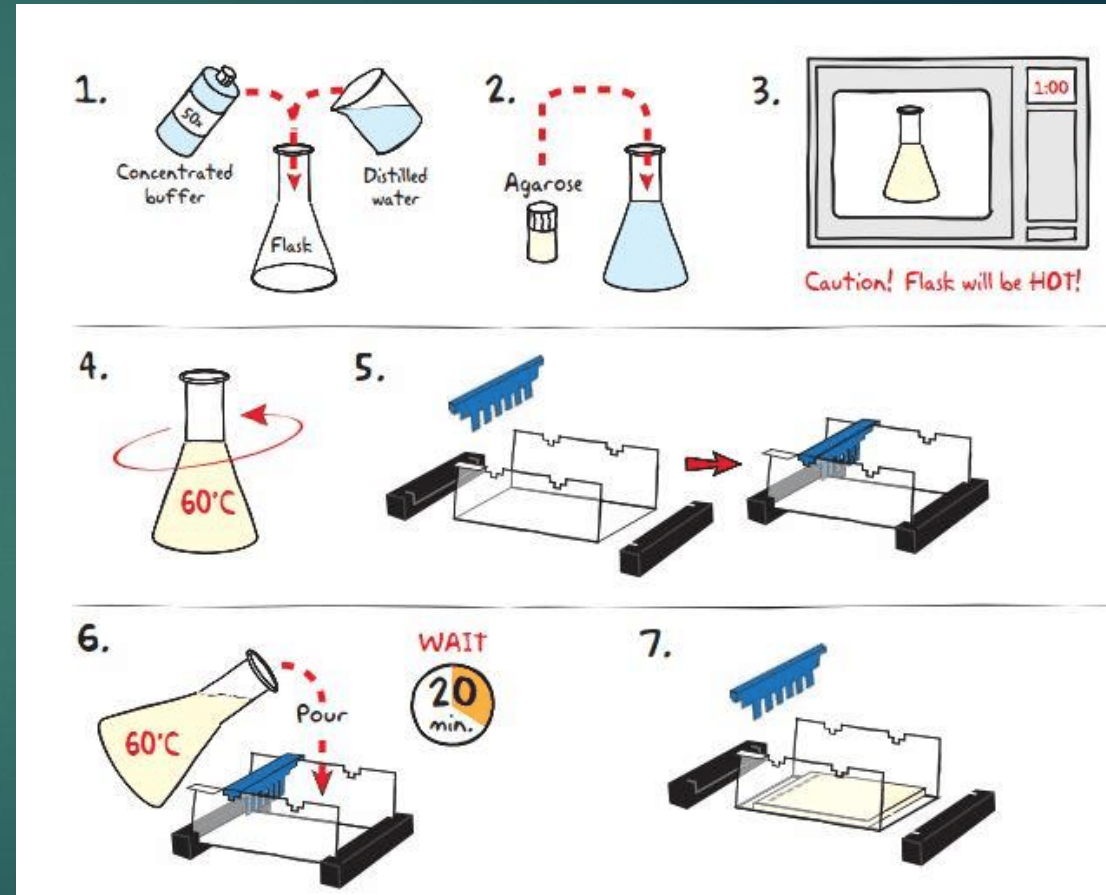


Agarose concentration (% w/v)	DNA fragment range (kb)
0.3*	5-60
0.5	1-30
0.7	0.8-12
1.0	0.5-10
1.2	0.4-7
1.5	0.2-3
2.0*	0.05-2

# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

## Προετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης

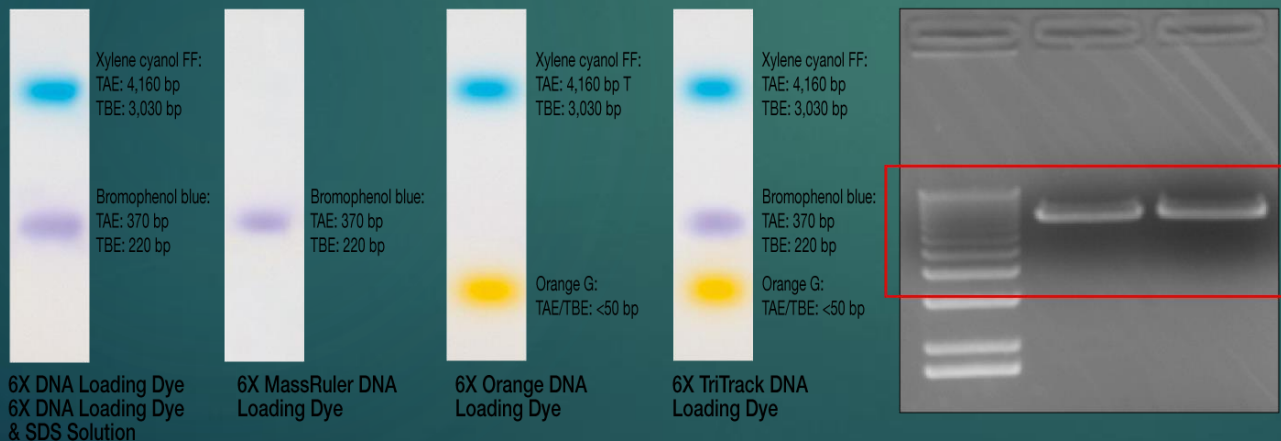
1. Επιλέγεται η κατάλληλη συγκέντρωση του πηκτώματος.
2. Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης και προστίθεται σε επαρκή ποσότητα διαλύματος ηλεκτροφόρησης Tris Acetate Acid/EDTA (TAE) ή Tris Borate Acid/EDTA (TBE) ώστε να πληρωθεί το εκμαγείο του πηκτώματος. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές.
3. Η κωνική φιάλη με την αγαρόζη ψύχεται στους  $\sim 55^{\circ}\text{C}$ . Στο στάδιο αυτό συνήθως προστίθεται χρωστική παρατήρησης του DNA
4. Τοποθέτηση της ρευστής αγαρόζης στο εκμαγείο με τα χτενάκια. Αν δημιουργηθούν φυσαλίδες, φροντίζουμε να τις απομακρύνουμε με τη βοήθεια ενός tip.
5. Ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης, το πήκτωμα σχηματίζεται σε χρονικό διάστημα 10-30 min και το χρώμα του γίνεται γαλακτόχρωμο
6. Στο τέλος αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενία»



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

## Διάλυμα Φόρτωσης 6X

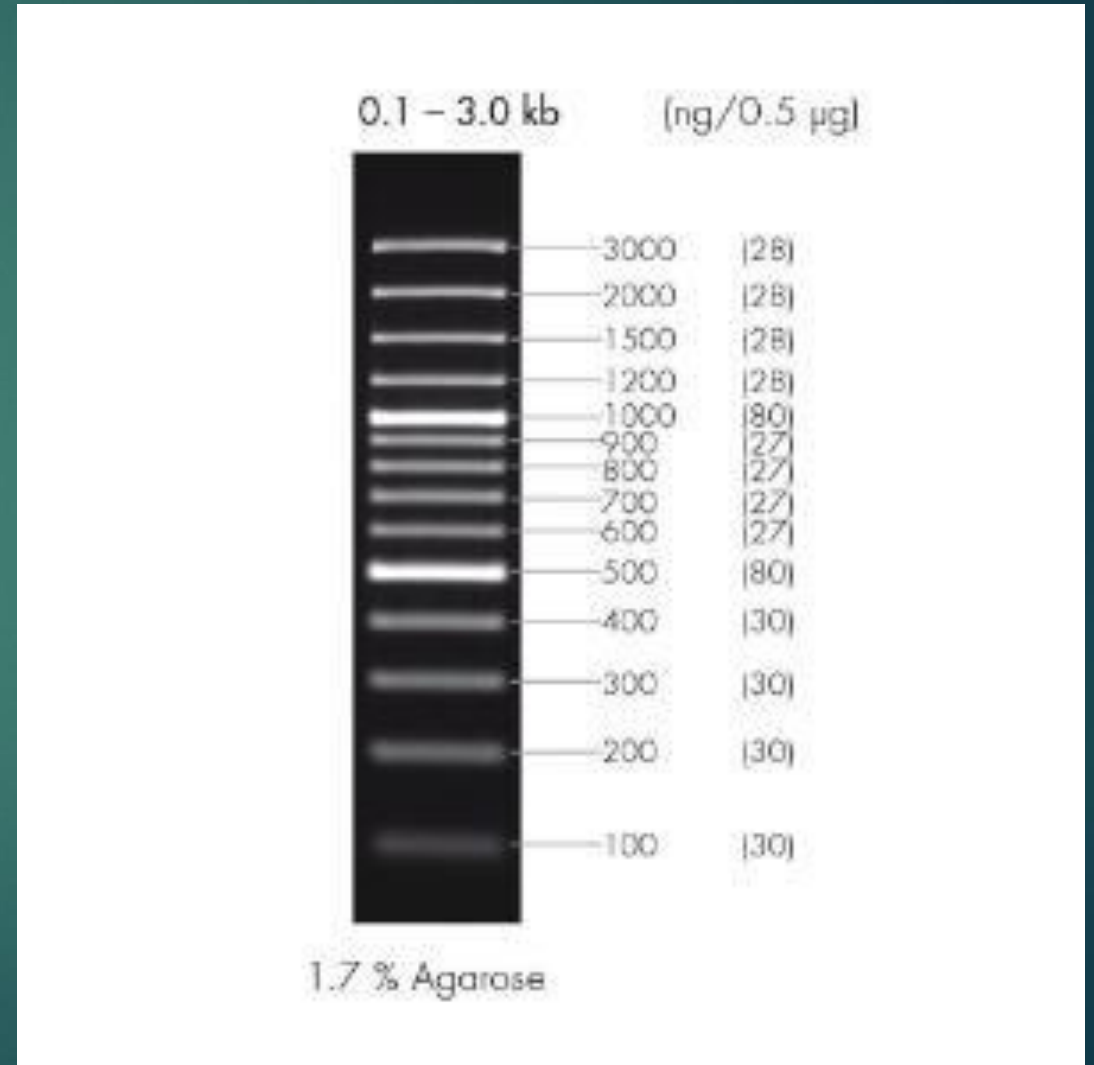
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης (dye marker): Οπτικό βοήθημα για τη φόρτωση των δειγμάτων και για την παρακολούθηση της ηλεκτροφορητικής προόδου. Κινείται πιο γρήγορα από το DNA (~300bp). Όταν φτάσει στην άκρη της πηκτής διακόπτουμε την ηλεκτροφόρηση.
- Άλλες χρωστικές ως δείκτες της ηλεκτροφόρησης π.χ Orange G
- Γλυκερόλη: Αύξηση της πυκνότητας του δείγματος, διευκόλυνση της φόρτωσης στη πηκτή και σταθεροποίηση στα πηγάδια.





# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Δείκτης μοριακών βαρών DNA (ladder)



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

## Τοποθέτηση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση

1. Μεταφορά του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
2. Προετοιμασία δειγμάτων: Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προετοιμάζονται κατάλληλα με την ανάμιξή τους με **διάλυμα «φόρτωσης» 6X**.
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων.
4. Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης: Το θετικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) τοποθετείται πάντα απέναντι από τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων, προκειμένου τα μόρια του DNA να μετακινηθούν κατά τη σωστή φορά στο πηκτώμα.
  1. Ρυθμίζεται η κατάλληλη τάση στο τροφοδοτικό.
  2. Τερματισμός της ηλεκτροφόρησης: Η πρόοδος της μετανάστευσης των μορίων DNA στο πηκτώμα εκτιμάται από τη μετακίνηση των χρωστικών του διαλύματος φόρτωσης ή από την παρατήρηση του πηκτώματος στην τράπεζα υπεριώδους.



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

## Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης

Για να απεικονιστούν οι ζώνες των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητη μια ουσία που να καθιστά ορατά τα μόρια του DNA.

Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια χρωστική που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα γι' αυτόν τον σκοπό. Παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm

**Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί η ουσία έχει μεταλλαξιογόνο και τερατογόνο δράση.**

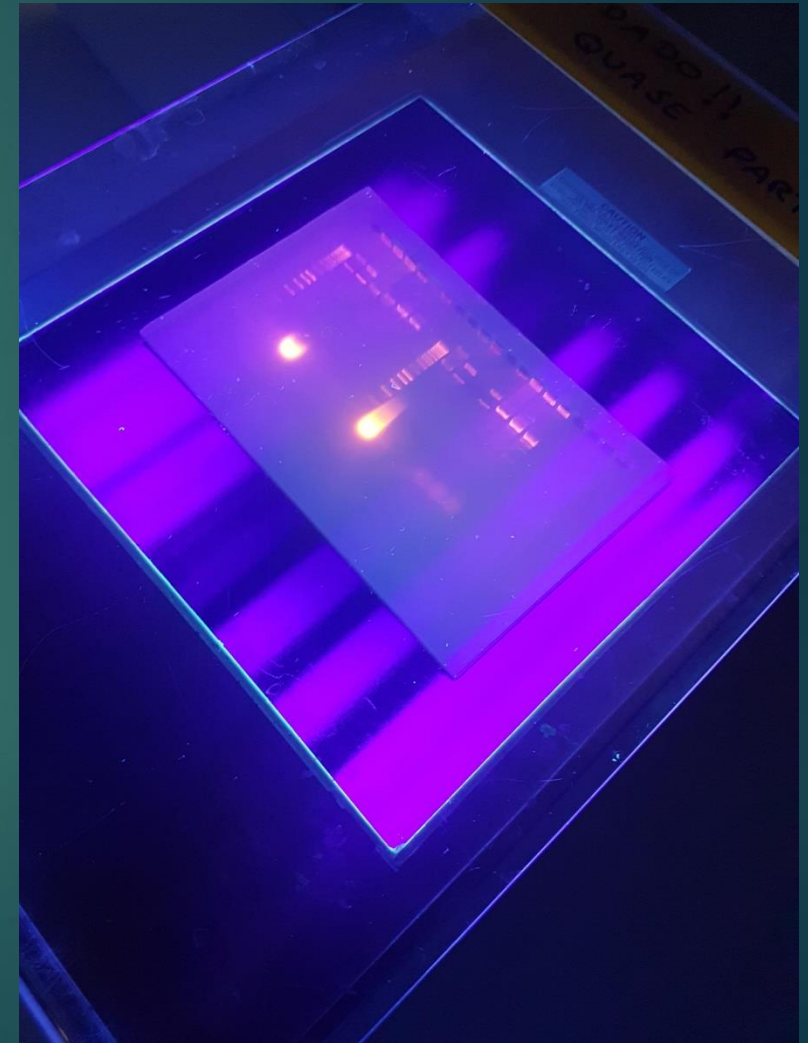
Τα τελευταία χρόνια διατίθενται στην αγορά νέες χρωστικές, που δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και δεν είναι τοξικές για τον άνθρωπο και το περιβάλλον.

# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

## Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης

Για την παρατήρηση του πηκτώματος:

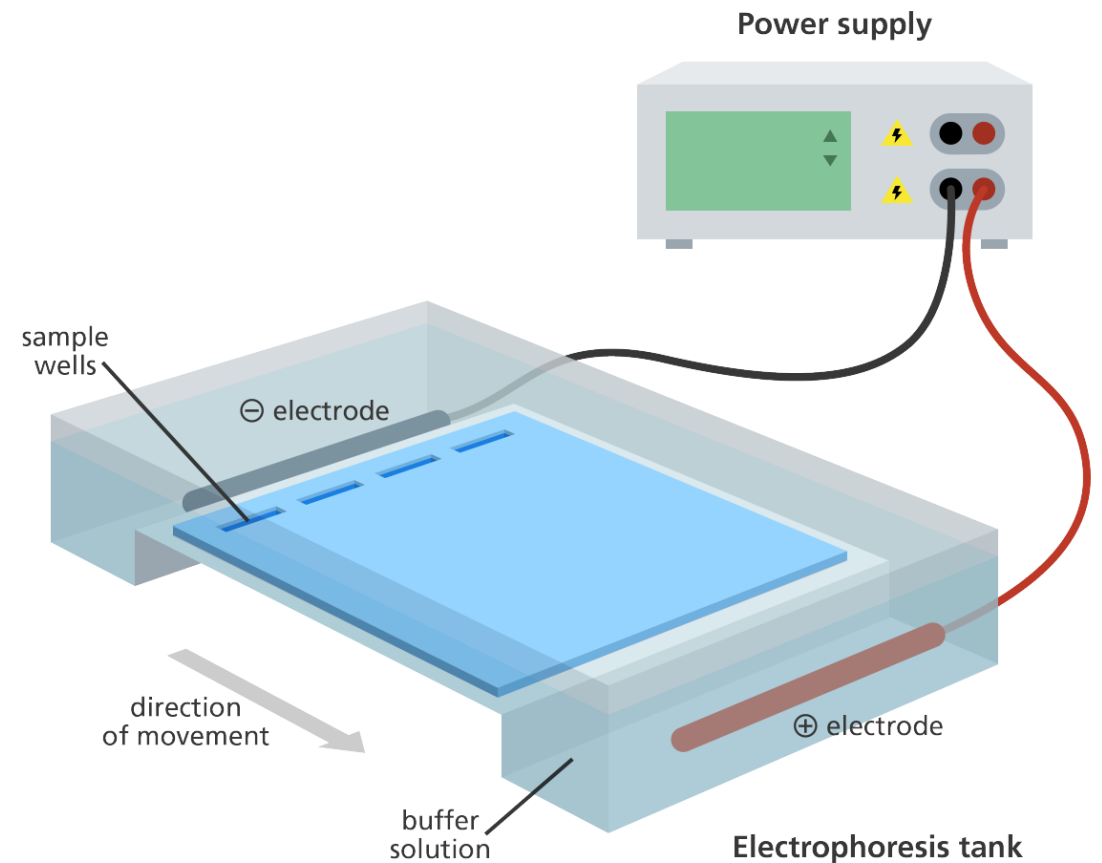
1. Το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας που βρίσκεται σε σκοτεινό θάλαμο. Με την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία τα μόρια του DNA φθορίζουν και γίνονται ορατά ως πορτοκαλόχρωμες ζώνες
2. Κατά την παρατήρηση του πηκτώματος λαμβάνονται μέτρα προστασίας. Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι επιβλαβής για τους οφθαλμούς και το δέρμα.
3. Η φωτογράφιση του πηκτώματος γίνεται με τη βοήθεια φωτογραφικών κώνων και ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής.



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

<https://www.youtube.com/watch?v=KKmiKKMDDhY>

<https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ&list=PLrAEgIY86I6wYIgx3iE-KvyaRFzwuixr&index=17>



# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

