

# DNS VIZSGÁLATA AGARÓZ GÉL ELEKTROFORÉZISSEL

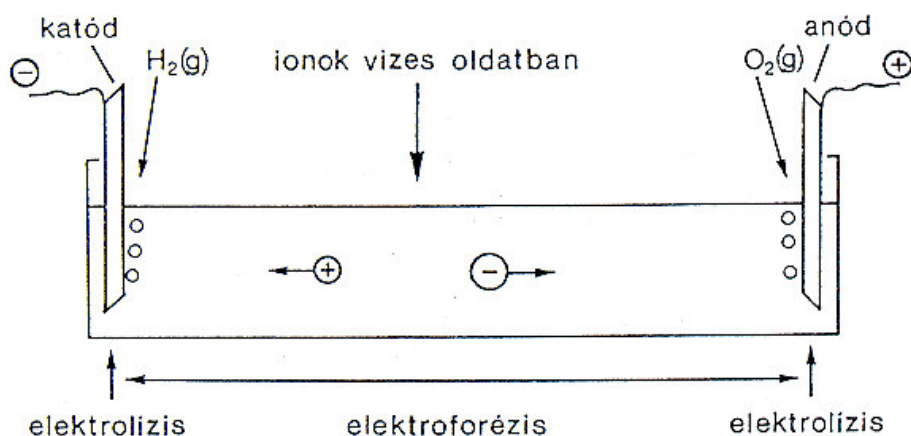
Forrás: Molekuláris biológiai módszerek (DEOEC jegyzet) - Dombrádi Viktor

## Az elektroforézis elvi alapjai

Töltéssel rendelkező részecskék elektromos térben töltésüknek megfelelő irányban mozognak. A pozitív töltésű kationok a negatív katód, míg a negatív töltésű anionok a pozitív anód felé haladnak. Az elektródok felületéhez érve az ionok töltésüket elvesztik. Elválasztás-technikai szempontból az ionok áramlása az ún. elektroforézis a lényeges; az ionok semlegesítődése az elektrolízis másodlagos kísérőfolyamatnak tekinthető.

Az ionok vándorlási sebességét töltéssűrűségük és az alkalmazott feszültség- gradiens nagysága szabja meg. A feszültség-gradiens egyenesen arányos a két elektród közötti feszültségkülönbséggel és fordítottan arányos az elektródok távolságával. Az elektródok távolsága a készülék geometriájától függ; mivel az elektródok fix beépítésűek, ezt a tényezőt nem áll módunkban megváltoztatni. Szabályozható viszont az elektródokra kapcsolt egyenáramú áramforrás, illetve egyenirányító feszültsége. Minél nagyobb a feszültségkülönbség (egy bizonyos határig), annál gyorsabb az elválasztás, azonban arra is gondolni kell, hogy a nagy feszültséghez nagyobb áramerősség tartozik; ami a készülék felmelegedéséhez vezet. Nagyobb hőmérsékleten viszont gyorsabb a diffúzió, ami az elválasztás minőségét rontja. Ezért a készülék hűthetőségét és az alkalmazott puffer-rendszer ellenállását figyelembe véve olyan optimális feszültséget kell megválasztani, ami a lehető legrövidebb idő alatt megfelelő elválasztást biztosít.

Az ionok töltéssűrűsége egyenesen arányos a nettó-töltéssel és fordítva arányos a mérettel. A méret megadásakor számításba kell venni az adott ion hidrátburkát is, mivel az ionhoz kötött vízréteg az ionnal együtt vándorol. A fenti szabály alól kivételt jelent a  $H^+$  és  $OH^-$ , melyek mozgékonyasága a vártnál sokkal nagyobb. A nagy mozgékonyaság oka az, hogy vizes oldatban a töltés a hidrogénhíddal összekötött vízmolekulákon keresztül vándorol a  $H^+$ , illetve  $OH^-$  aktuális elmozdulása nélkül. A fenti két ion nagy vándorlási sebessége miatt vizes oldatban a katódhoz a  $H^+$ , az anódhoz a  $OH^-$  ér először. Ezért, és a puffer alkotórészek redoxpotenciálja miatt az elektroforézist kísérő elektrolízis során a katódon  $H_2$ , az anódon  $O_2$  gáz keletkezik. Bár ez a folyamat az elválasztás szempontjából mellékes, az elektródon buborékok formájában megjelenő gáz minden mérőműszer nélkül is bizonyítja, hogy a rendszeren áram folyik át, azaz nincs kontaktushiba (1. ábra).

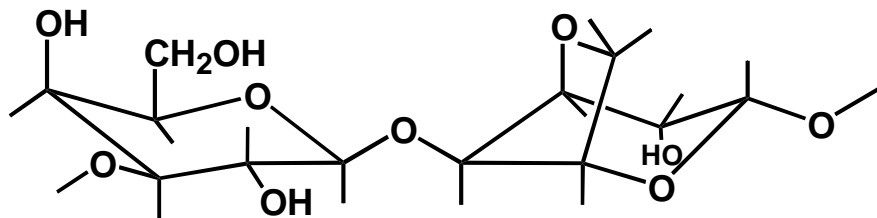


1. ábra. Az elektroforézis elvi vázlata

Az ionok eltérő töltéssűrűségük miatt eltérő sebességgel mozognak az elektromos térben, ami lehetővé teszi elválasztásukat. Gyenge savak, ill. bázisok disszociációjának mértéke, és így a töltéssel rendelkező ionok kialakulásának mértéke, a közeg pH-jától függ. Ikerionos és poliionos anyagok esetében a pH nemcsak a vándorlás sebességét, de annak irányát is megszabja. Egy adott anyag ionjainak töltését és méretét komplexképzők segítségével is lehet módosítani. Ezért az elválasztást az alkalmazott puffer pH-ja és adalékanyagok jelenléte alapvetően befolyásolja.

### Agaróz gél elektroforézis

Az agaróz lineáris poliszacharid, melyet tengeri algából nyernek. A polimert alkotó diszacharid-egység képlete a következő:



A kereskedelemben kapható agaróz nem teljesen tiszta, más szénhidrátokat, sókat, sőt fehérjéket is tartalmazhat. Mivel az agaróz tisztasága nagymértékben befolyásolja az elválasztás minőségét és a DNS további felhasználhatóságát, újabban speciálisan DNS tisztításra alkalmas készítményeket hoznak forgalomba. Az agaróz géleket általában nagyobb méretű molekulák szeparálására alkalmazzák hatékonyan.

A DNS vándorlási sebességét az agaróz gélben számos tényező befolyásolja. A DNS neutrális pH mellett negatív töltésű és az anód felé mozog. Az elektromos tér hatására a kettős hélixet alkotó DNS a méretének logaritmusával fordított arányban lévő sebességgel vándorol a gélben. Azaz a nagyobb DNS darabok lassabban, a kisebbek gyorsabban mozognak a molekulaszűrő hatás miatt.

A gél átlagos pórusmérete az agaróz koncentrációjától függ és megszabja, hogy a gél milyen méretű DNS darabokat tud hatékonyan szétválasztani.

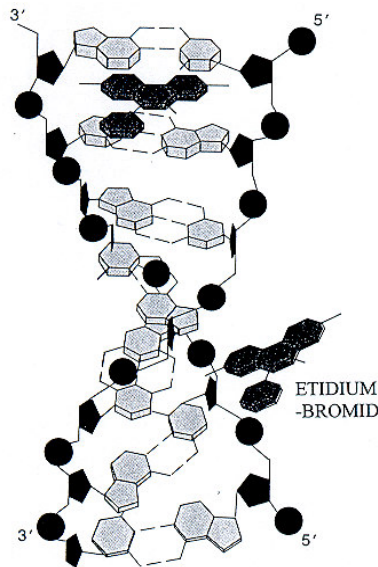
A DNS mérete mellett annak alakja is módosítja a vándorlás sebességét; a szuperhelikális, cirkuláris és lineáris DNS mozgékonyasága az elektroforézis körülményeitől (áramerősség, ionerősség) függő módon eltérő. Ezért célszerű a vizsgálni kívánt DNS-hez hasonló szerkezetű ismert méretű DNS darabokból standardokat alkalmazni, és az ismeretlen mozgékonyaságát ehhez viszonyítani.

Újabban népszerűvé vált az ún. „1 kb-os létra” alkalmazása. Ez többszörösen egymáshoz ligált 1018 bázispár hosszúságú DNS darabok sorozata, amelyben megtalálható a vektor 1636 bp méretű sávja is. Egy tipikus létra 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, stb méretű sávokból áll.

A gélben lévő DNS-t ethidium-bromiddal festik. A festék molekulái beékelődnek a DNS bázispárjai közé. A kötött ethidium-bromid 302 és 366 nm-en ultraibolya sugárzást nyel el és 550 nm-es vöröses narancsszínű fluoresszcens fényt bocsát ki. Tehát a DNS-hez kötött festék UV fényben láthatóvá válik. A festék interkalálódását a kettősszalú DNS bázispárjai között a 3. ábra mutatja. A DNS festését legtöbbször az elválasztás után végzik, azonban

meggyorsítható a detektálás oly módon, hogy az etidium bromidot már a gél készítésekor belekeverjük a gél anyagába.

### AZ ETIDIUM BROMID KARCINOGEN, A VELE VALÓ MUNKA ÉS A FELESLEGESSÉ VÁLÓ HULLADÉK MEGSEMMISÍTÉSE NAGY KÖRÜLTEKINTÉST IGÉNYEL!



3. ábra. DNS festése etidium-bromiddal

#### A kísérlet kivitelezése

##### *Agaróz gél készítése*

A gélyagykákat helyezze a futtató tálcákba majd a rögzítő csavar segítségével folyásmentesen zárja le és helyezze a tálcákat vízszintes felületre. Helyezze a tálca mellé a mintafelvívő fésűket.

500 cm<sup>3</sup>-es Elrenmeyer-lombikba mérjen ki 1,5 g agarózt. Öntse az agarózra a 100 cm<sup>3</sup> TAE<sup>1</sup> puffert és a lombik száját egy műanyag tetővel zárja le. Oldja fel az agarózt forrásig történő melegítéssel, és gyakori rázogatóással. A jó oldat vízszerű, áttetsző, sűrűbb, agaróz-szemcséket nem tartalmaz. Hűtse le az agaróz oldatot kb. 60°C-ra, adjon hozzá 1ul EtBr-ot és buborékmentesen öntse az előkészített futtató tálcába. Az agaróz gél 20-30perc alatt szilárdul meg.

Helyezze a gélt a futtató kádba (vigyázzon a gél nehogy lecsússzon a tálcáról!), és öntsön rá annyi elektroforézis TAE puffert, hogy az kb. 2 mm-es rétegben fedje el a gélt. Óvatosan, de határozott mozdulattal húzza ki a fésűt a gélből.

(1.-Tris, ecetsav, EDTA elegyét tartalmazó pufferoldat)

##### *Gélelektroforézis*

Ha a gél elkészítése jól sikerült 8 mintafelvívő vályú áll rendelkezésre. (Ha a vályúk közül néhány megsérült, ezeket hagyja üresen!) Az 1. vályúba mikropipetta segítségével pipetázzon 5 µl DNS "létrát", majd a következő vályúkba vigyen fel 5ul ismert DNS és 5 µl ismeretlen DNS mintát növekvő mintaszám szerint. A minták nagy sűrűségük miatt a vályú alján gyűlnek össze. A diffúzió elkerülése érdekében igyekezzen a mintafelvitelt gyorsan elvégezni. Jegyezze fel, hogy mely vályúba mely ismeretlen került. Zárja le a futtató kádat az

elektromos csatlakozókat tartalmazó fedővel. A vezetékeket csatlakoztassa a tápegységhez. A gélelektroforetikus készülékkel az optimális sebességű elválasztáshoz 60-80 V feszültséget kell biztosítani. Az elektroforézist 80 V konstans feszültséggel 30 percig végezze. Amikor a jelzőfesték a gélben az út kb. 2/3-át megtette, kapcsolja ki az áramforrást és húzza ki a banándugókat a stabilizátorból.

#### *Minták detektálása*

Gyors detektálást biztosít, ha a gél öntésekor a gélpufferbe oldjuk fel az etidium bromidot. Ekkor a festék interkalálódása már az elválasztás során megtörténik, így nincs szükség külön festési lépésre. Ha ezt a módszert választjuk, természetesen már a gélöntés pillanatától kezdve alkalmazni kell az etidium bromid kezelésére vonatkozó óvintézkedéseket. Arra is gondolni kell, hogy a festék kifut a gélből, ami a puffer elszennyeződéséhez és nem teljesen egyenletes festési intenzitáshoz vezet. A festési módszer megválasztásakor mérlegelnünk kell a gyorsaságból adódó előnyöket és az ezzel járó nagyobb szennyezés veszélyt, a képminőség romlását és a veszélyes hulladék megsemmisítésével járó többletmunkát is.

#### *A gél vizsgálata*

A DNS sávok detektálása ( BIO-RAD Gel Doc képalkotó rendszer, mely magában foglalja: sötétkamra, UV átvilágító, epi-fehér megvilágítás, kamera, szoftver) UV átvilágító asztalon történik. Helyezze a gélt az átvilágító lapra és zárja be a védő fedelet. Kapcsolja be az UV fényt az asztalon lévő kapcsolóval. Az UV fényben láthatóvá válnak a gélben lévő DNS sávok. Fényképezze le a gél képét, így lehetővé válik az adatok elektronikus továbbítása, tárolása és nyomtatása. A számítógépes technika segítségével megvalósítható a kép manipulálása (kontraszt, színintenzitás, méret beállítása), azonban ne feledkezzünk meg arról, hogy valódi dokumentációs értéke csak az eredeti felvételeknek van. A vizsgálat után a gélt az etidium-bromid tartalmú szilárd hulladék gyűjtésére rendszeresített tárolóba tegye!

#### A gélkép alapján a következő információk nyerhetők:

(1) A DNS sávok helyzete és intenzitása felvilágosítást ad a minta tisztaságáról. Ha a várt sáv(ok) mellett további sáv(ok) is észlelhetők, ez a minta szennyezettségére utal. A várt és extra sávok intenzitása a szennyezés mértékéről ad tájékoztatást. Elképzelhető, hogy a szennyezés a minta degradációjának eredménye, ilyenkor a vártnál kisebb méretű extra sávok jelennek meg. Az aspecifikus módon degradálódott DNS nem ad jól elkülöníthető sávokat, a gélen széles mérettartományban detektálható festődés. Hasonlóan elmosódott sávot okozhat mRNS szennyezés is.

(2) Ha a minta DNS pontos koncentrációját nem ismerjük, a sáv(ok) intenzitásából következtethetünk a felvitt minta körülbelüli koncentrációjára. Ilyenkor célszerű a mintából különböző térfogatokat felvinni egymás melletti vályúkba és a festődés intenzitását ismert mennyiségű DNS-t tartalmazó sávok intenzitásával összehasonlítani