



GEL ELEKTROFOREZA

Seminar pri predmetu Molekularna Biofizika

Avtorica: Tjaša Parkelj

Povzetek: V tem seminarju bom predstavila fizikalno ozadje elektroforeze. Začela bom z opisom gibanja nabitega delca v električnem polju, nato bom govorila o električnem dvojnem sloju, ki se ustvari okoli delca v raztopini. Opisala bom podoben pojav v primeru DNK molekule v raztopini, ki ga imenujemo Manningova kondenzacija. Nato bom prešla na gibanje takšnega sistema v prosti raztopini. Pokazala bom, da je takšno gibanje neodvisno od velikosti delcev. V sistem bom uvedla gel in predstavila reptacijski model, ki opisuje gibanje polimerov skozi gel pod vplivom električnega polja. Za konec bom opisala še sam postopek gel elektroforeze in predstavila nekaj rezultatov.

1. Kazalo

2.	UVOD	3
3.	ELEKTROFOREZA.....	5
3.1	Električni dvojni sloj.....	6
3.2	Maningova kondenzacija.....	7
3.3	Elektroforeza v prosti raztopini	7
3.4	Gel elektroforeza	9
3.5	Reptacijski model	9
3.6	Konformacija DNK ob gibanju skozi gel v odvisnosti od velikosti polja.....	11
4.	POSTOPEK GEL ELEKTROFOREZE	12
5.	ZAKLJUČEK	13
6.	VIRI	14

2. UVOD

Deoksiribonukleinska kislina (DNK) je molekula, ki je nosilka genetske informacije v vseh živih bitjih. Je nerazvejan polimer, katerega osnovna enota je nukleotid. Nukleotid v DNK je sestavljen iz sladkorja (deoksiridoza), dušikove baze (adenin, citazin, gvanin, timin) in fosfatne skupine. DNK ima obliko dvojne vijačnice, pri čemer se dve molekuli DNK ovijeta ena okrog druge. Pri tem so dušikove baze znotraj vijačnice in se medsebojno vežejo. Vezava nukleotidov je selektivna; adenin se vedno veže s timinom, citazin pa vedno z gvaninom (Watson-Crickovo pravilo baznih parov). Štirje različni nukleotidi tako tvorijo genetsko abecedo življenja na Zemlji. Njihovo zaporedje namreč določa pomen genetske informacije DNK molekule [1,2].

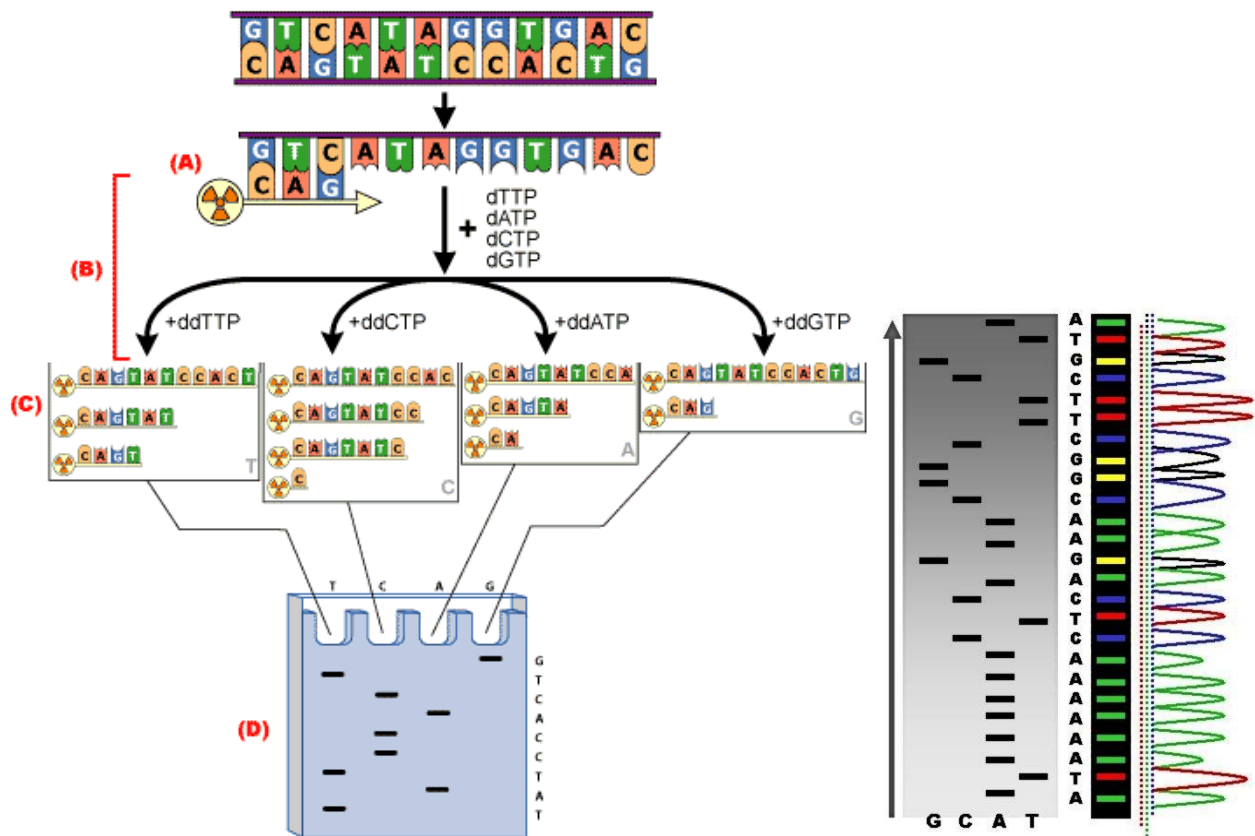
Zaporedje nukleotidov lahko ugotovimo s sekvenciranjem DNK molekule. Prvi postopek sekvenciranja DNK, ki je še danes v uporabi, je leta 1977 razvil Frederic Sangar in se imenuje metoda zaključene verige (Chain Termination Method) [3].

Za začetek potrebujemo raztopino z enojnimi verigami DNK. Raztopini dodamo še DNK-polimerazo, oligonukleotidni začetnik in nukleotide z različnimi dušikovimi bazami.

DNK-polimeraza je encim, ki omogoča sestavljanje posameznih monomernih enot (nukleotidov) v polimerno verigo. Kateri nukleotid (adenin, gvanin, citazin, timin) se bo vključil v verigo je odvisno od zaporedja komplementarnih nukleotidov na primarni verigi.

Da lahko DNK-polimeraza začne podvajati verigo, se mora na en konec primarne DNK verige najprej vezati oligonukleotidni začetnik ali pobudnik (angl. *primer*). Ta oligonukleotid, z znanim zaporedjem nukleotidov, ima prost konec z OH skupino, ki omogoča nadaljno vezavo nukleotidov ob prisotnosti DNK-polimeraze.

Zgoraj opisano mešanico nato razdelimo na štiri dele, vsakemu pa dodamo po eno vrsto nukleotidov, ki so označeni s fluorescentnimi markerji. Značilnost teh nukleotidov je tudi, da jim manjka OH skupina, na katero bi se lahko vezal naslednji nukleotid, zato se ob njihovi vezavi podvajanje zaključí. Vsaka veriga ima torej na koncu en označen nukleotid [1].



Slika 1: Dvojna vijačnica se s segrevanjem loči na dve enojni vijačnici. Na primarno enojno vijačnico se najprej veže pobudnik z znanim zaporedjem nukleotidov, nato se pod vplivom DNK polimeraze vežejo posamezni nukleotidi, ki so komplementarni tistim na primarni verigi. Proces poteka dokler se ne veže označevalni nukleotid. Vzorci z različnimi označevalnimi nukleotidi vstavimo v gel poleg znane lestvice in poženemo električni tok. Po nekem času tok prekinemo. V tem času se fragmenti razporedijo po velikosti. Zdaj lahko razberemo zaporedje nukleotidov, tako da pogledamo v katerem stolpcu je fragment z določeno dolžino. To zaporedje je ravno komplementarno zaporedju nukleotidov primarne DNK verige [4].

Eden izmed postopkov, ki nam omogoča razvrščanje DNK molekul po velikosti je gel elektroforeza [1,5]. Elektroforeza je premikanje nabitih delcev v raztopini pod vplivom električnega polja [6]. Tudi molekula DNK v raztopini disociira in je pravzaprav ena izmed najbolj nabitih molekul v naravi. Hitrost potovanja DNK molekul pod vplivom električnega polja v prosti raztopini je neodvisna od njene velikosti in oblike, zato je za ločevanje molekul po velikosti ključna uporaba gela. Razmrežen gel namreč ovira gibanje teh polielektrolitov, daljše molekule v enakem času prepotujejo krajšo pot skozi gel kot krajše molekule.

Gel elektroforeza nam da razporeditev DNK po velikosti in po vrsti zadnjega označenega nukleotida. Tako lahko razberemo zaporedje nukleotidov, ki je ravno komplementarno zaporedju nukleotidov primarne verige.

Sekvenciranje DNK molekul je danes avtomatiziran postopek, ki s prepoznavanjem označenih nukleotidov sestavi elektroforetski diagram z zaporedjem nukleotidov (Slika 1).

3. ELEKTROFOREZA

Elektroforeza je gibanje nabitih delcev v tekočini pod vplivom električnega polja. Za začetek si pogledjmo poenostavljen model delca z nabojem Q v zunanjem električnem polju E med dvema elektrodama (Slika 2). Predpostavimo, da se delec lahko giba le vzdolž smeri električnega polja. Električna sila na delec je podana z enačbo [6]:

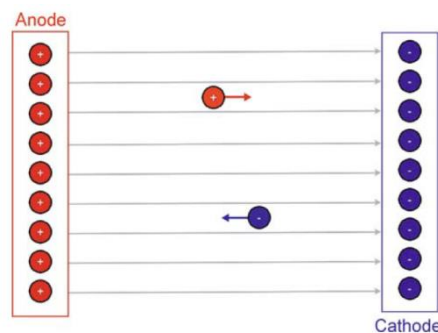
$$F_e = QE = \frac{QU}{L}, \quad (1)$$

kjer je U napetost, L pa razdalja med elektrodama. Ker se delec giblje skozi tekočino z viskoznostjo η , nanj v nasprotni smeri gibanja deluje sila upora:

$$F_u = -6\pi\eta Rv, \quad (2)$$

pri čemer je R radij nabitega delca. Ker je takšno gibanje tipično močno dušeno, lahko sili izenačimo in izrazimo elektroforetsko hitrost delca:

$$v = \frac{EQ}{6\pi\eta R}. \quad (3)$$



Slika 2: Elektroforeza različno nabitih ionov v homogenem električnem polju. Negativno nabit ion se bo gibal proti pozitivno nabiti elektrodi in obratno [6].

Za opis gibanja delca pri elektroforezi uvedemo novo količino - elektroforetsko mobilnost, ki je definirana kot:

$$\mu \equiv \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi\eta R} \quad (4)$$

Določanje elektroforetske mobilnosti molekul in polielektrolitov, kot je na primer molekula DNK, ni tako enostavno, saj molekule v raztopini disociirajo, okoli njih pa se ustvari nekakšna ionska atmosfera – električni dvojni sloj.

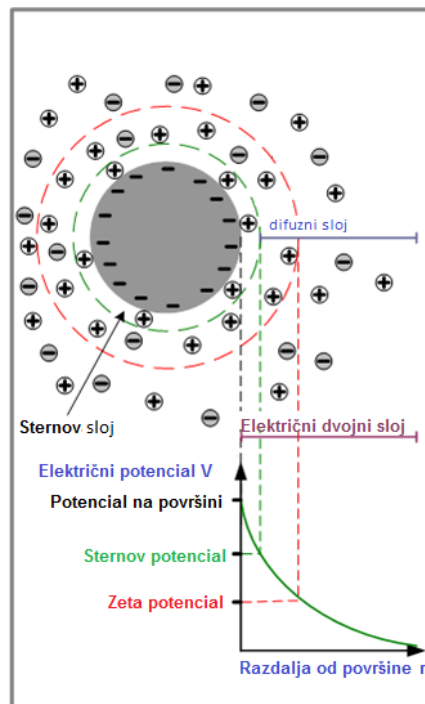
3.1 Električni dvojni sloj

Nevtralna molekula v raztopini disociira in s tem vpliva na razporeditev okoliških ionov. Molekula privlači nasprotno nabite ione, ki se adsorbirajo na njeno površino in tvorijo plast protiionov, tako imenovani Sternov sloj.

Sternov sloj obdaja difuzni sloj, ki vsebuje tako pozitivno kot negativno nabite ione. Ioni v tem sloju so mobilni, na njihovo porazdelitev po eni strani vpliva elektrostatski privlak, po drugi strani pa difuzija. Zaradi elektrostatskega privlaka površine se želijo protiioni urediti v njeni bližini, zaradi difuzije pa so ioni z oddaljenostjo od površine vse bolj enakomerno razporejeni. Oba sloja skupaj tvorita električni dvojni sloj (Slika 3). Meja med slojema ni natančno določena in je odvisna tudi od časovne skale. Približno jo podaja Bjerrumova dolžina:

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_b k_B T}, \quad (5)$$

kjer je ϵ_b dielektričnost raztopine. Bjerrumova dolžina je reda velikosti nm, v vodi je pri sobni temperaturi 0.7 nm [1].



Slika 3: Shema električnega dvojnega sloja predstavlja negativno nabit delec, ki ga obdaja plast pozitivno nabitih ionov imenovana Sternov sloj in zunanji difuzni sloj. Shemi je priložen graf, s katerega je razvidno, da električni potencial pojema eksponentno z razdaljo od površine delca.

V teoriji povprečnega polja je ravnovesna porazdelitev mobilnih ionov podana z Poisson-Boltzmannovo enačbo. Za našo obravnavo je dovolj, če vzamemo njeno linearizirano obliko znotraj Debye-Huckelove teorije. Ta velja za difuzno plast in pravi, da so zunanja

električna polja v elektrolitu senčena s potencialom V , ki eksponentno pada z razdaljo r od vrednosti V_0 na meji:

$$V = V_0 e^{-\kappa r} \quad (6)$$

pri čemer definiramo karakteristično razdaljo senčenja, ki jo imenujemo Debyeova dolžina, in je podana z enačbo:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_b \epsilon_0 k_B T}{\rho e^2}} \quad (7)$$

kjer je ρ številska gostota ionov z nabojem e .

Naboj nabite molekule v raztopini je torej senčen. V primer DNK namesto dvojnega električnega sloja DNK govorimo o Manningovi kondenzaciji [5].

3.2 Maningova kondenzacija

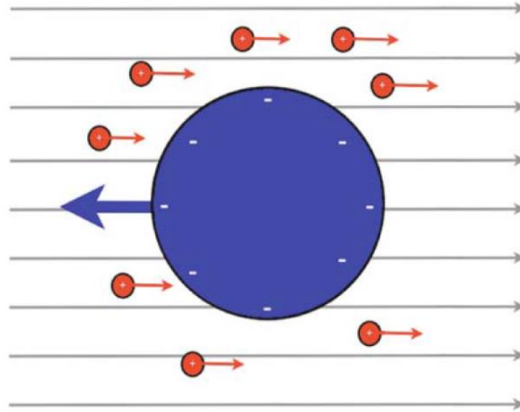
Molekula DNK v vodni raztopini disociira, tako da se H^+ ioni ločijo od fosfatnih skupin. S tem molekula pridobi negativni naboj. V prvem približku je skupni naboj fragmenta dvojne DNK verige enak

$$Q = 2eN_b, \quad (8)$$

kjer je e osnovni elektronski naboj, N_b pa število baznih parov. Podobno kot v primeru nabite molekule v raztopini, se tudi okoli molekule DNK tvori sloj adsorbiranih protiionov debeline l_b (Bjerrumova dolžina), ki senči naboj molekule. Temu pravimo Manningova kondenzacija. Zaradi tega pojava je skupni naboj DNK manjši, kot bi pričakovali, če bi upoštevali samo disociacijo fosfatnih skupin in znaša približno $-2e_0$ na en bazni par [5].

3.3 Elektroforeza v prosti raztopini

Zunanja električna sila deluje tako na nabit delec, kot na ionski oblak okoli njega. Pod njenim vplivom se molekula giblje v eno smer, ionski oblak pa v nasprotno smer, gibanje obeh pa zavira viskozni upor (Slika 4) [6].



Slika 4: Električna sila deluje na gibanje nabitega delca v eni smeri in na gibanje ionskega oblaka okoli njega v drugi smeri. [6]

Natančen račun tega hidrodinamskega gibanja presega okvir tega seminarja [7], zato si oglejmo le dva limitna primera. V primeru debelega Debyevega sloja ($\kappa^{-1} \gg R$) so protioni enakomerno porazdeljeni in ne vplivajo na gibanje delca, zato lahko ločeno izračunamo električno silo in viskozni upor. Mobilnost je odvisna tudi od oblike in je za okrogel delec radija R kar enaka enačbi (4). Mobilnost je v tem primeru med drugim odvisna od velikosti delca.

V primeru tankega Debyevega sloja ($\kappa^{-1} \ll R$), je strig omejen na plast κ^{-1} okoli delca. Potrebno je rešiti Navier- Stokesovo enačbo:

$$\eta \nabla^2 V_p = -\rho E \quad (9)$$

kjer je ρ rešitev Debye-Huckelovega modela znotraj Debyeve plasti ter nič zunaj. Delec se v tej limiti giblje v nasprotni smeri glede na raztopino z mobilnostjo [1,6]:

$$\mu = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_b \zeta}{\eta}, \quad (10)$$

kjer je ζ zeta potencial. To je fenomenološki parameter, ki ga definiramo kot potencial na razdalji od površine delca, pri kateri se pojavi strig. Opazimo, da je v tem primeru mobilnost delcev neodvisna od njihove velikosti.

Delci se v prosti tekočini v limiti tankega Debyevega sloja gibajo z enako hitrostjo ne glede na njihovo velikost. Tudi v primeru DNK v raztopini je Debyeve plast tanka, kar pomeni da elektroforeza DNK v prosti raztopini ne omogoča ločevanja molekul po velikosti. To lahko rešimo, če med elektrodi dodamo gel.

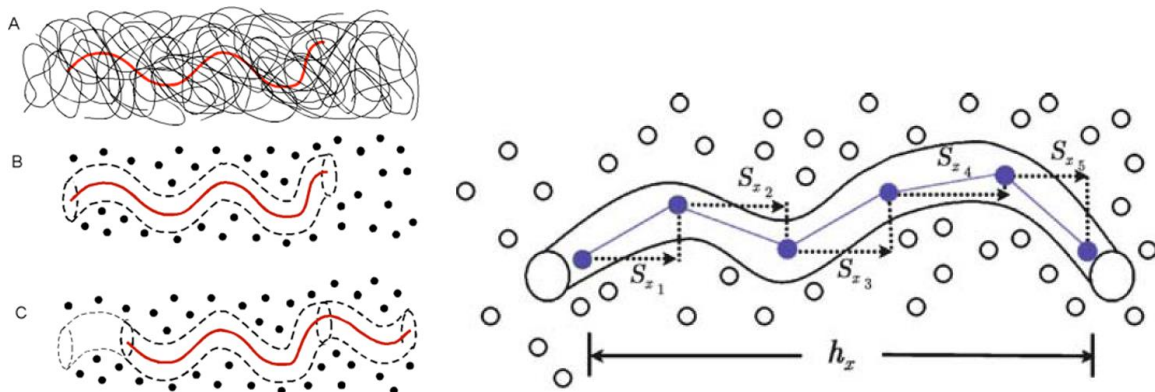
3.4 Gel elektroforeza

Gel elektroforeza se od elektroforeze v prosti raztopini razlikuje po tem, da med elektrodi vstavimo gel, po katerem potujejo molekule in omogoča njihovo ločevanje po velikosti.

3.5 Reptacijski model

Mobilnost DNK verige v gelu pod vplivom električnega polja dobro opiše reptacijski model. Mrežo gela lahko obravnavamo kot statično omrežje ovir, ki tvori cev znotraj katere se premika naša veriga. Znotraj te cevi se polimer v smeri električnega polja plazi kot kača, zato se modelu reče reptacijski model (Slika 5) [1,6].

DNK je fleksibilni polielektrolit, ki ga lahko obravnavamo kot polimer z N segmentov dolžine l , tako da je skupna dolžina verige enaka $L = Nl$. Električna sila, ki deluje na posamezen segment je odvisna od njegovega naboja na enoto dolžine q in njegove orientacije glede na smer električnega polja. Projekcijo dolžine enega segmenta na smer električnega polja je enaka s_x (Slika 6).



Slika 5: (a) Zamrežen gel okoli DNK verige. (b) Gibanje verige je omejeno na cev, ki jo tvorijo okoliška vlakna gela. (c) Ko se veriga splazi skozi eno dolžino cevi nadaljuje v naslednjo cev.

Slika 6: DNK veriga dolžine L , skupna projekcija dolžine enega segmenta na smer električnega polja, projekcija na smer električnega polja h_x [mikroflu].

Skupna električna sila na verigo je enaka vsoti sil po posameznih segmentih:

$$F_e = \sum (qE) s_x \quad (11)$$

Kot lahko vidimo na Sliki 6 je skupna projekcija verige enaka:

$$h_x = \sum s_x \quad (12)$$

Tako lahko skupno električno silo na verigo napišemo kot:

$$F_e = QE \frac{h_x}{L}, \quad (13)$$

kjer je Q enak skupnemu naboju verige. Gibanju vzdolž cevi pod vplivom električne sile nasprotuje sila trenja:

$$F_t = -\xi_c v_c, \quad (14)$$

pri čemer je ξ_c koeficient trenja ob gibanju vzdolž cevi s hitrostjo v_c . Če izenačimo sili lahko izpostavimo hitrost gibanja po cevi, ki je enaka:

$$v_c = \frac{QE h_x}{\xi_c L} \quad (15)$$

Čas, ki ga molekula potrebuje, da se preplazi skozi cev dolžine L je enak:

$$t = \frac{L}{v_c} \quad (16)$$

v tem času se molekula dejansko premakne le za h_x glede na smer električnega polja. To pomeni, da je njena hitrost v smeri električnega polja enaka:

$$v_x = \frac{h_x}{L/v_c} = \frac{Q}{\xi_c} E \left(\frac{h_x^2}{L^2} \right) \quad (17)$$

Hitrost gibanja verige je torej odvisna od razmerja med njeno dolžino in projekcijo na električno polje, od koeficienta trenja, njenega naboja in velikosti električnega polja.

Ko se molekula dolžine L priplazi skozi eno cev dolžine L s projekcijo h_x vstopi v novo cev, z novo projekcijo. Na svoji poti skozi gel veriga prepotuje več takšnih cevi, eno za drugo. Elektroforetsko mobilnost verige definiramo kot povprečno mobilnost skozi vsako posamezno cev:

$$\mu = \frac{v_x}{E} = \mu_0 \frac{\langle h_x^2 \rangle}{L^2}, \quad (18)$$

kjer je μ_0 mobilnost verige v prosti raztopini, $\langle \dots \rangle$ pa povprečje po več ceveh.

3.6 Konformacija DNK ob gibanju skozi gel v odvisnosti od velikosti polja

Konformacija DNK ob gibanju skozi gel je odvisna od velikosti električnega polja in njene dolžine. V primeru šibkega električnega polja ali kratkih dolžin, veriga ni močno deformirana in ohrani Gaussovsko konformacijo (takšno konformacijo zavzame DNK v gelu brez prisotnosti električnega polja). V tej konformaciji je njena velikost proporcionalna \sqrt{L} . Reptacijska cev ima v tem primeru povprečno iztegnjenost [6]:

$$\langle h_x^2 \rangle \sim L \quad (19)$$

Mobilnost takšnih verig je odvisna od dolžine molekule.

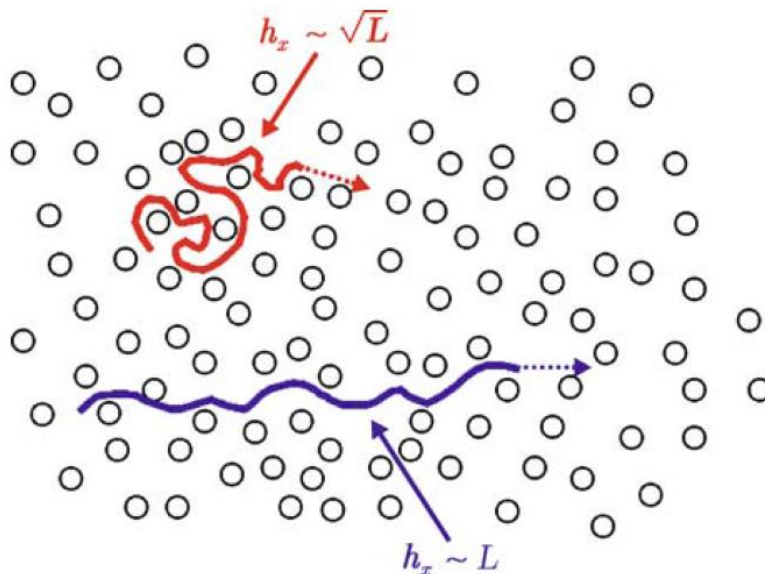
$$\mu = \frac{\mu_0}{L} \quad (20)$$

V primeru močnih polj ali velikih dolžin pa se veriga ob gibanju močno raztegne:

$$\langle h_x^2 \rangle \sim L^2 \quad (21)$$

V tem primeru mobilnost ni odvisna od molekulske teže in je kar enaka mobilnosti v prosti raztopini:

$$\mu = \mu_0 \quad (22)$$



Slika 6: V primeru kratkih verig in šibkih električnih polj DNK obdrži svojo konformacijo. Velikost njene projekcije na smer električnega polja je reda velikosti \sqrt{L} za verigo dolžine L (rdeča). V primeru dolgih verig ali močnih polj se veriga iztegne in orientira v smeri električnega polja. Projekcija verige na smer električnega polja je takrat reda velikosti dolžine verige L (modra) [mikroflu].

Z uporabo močnega električnega polja ali v primeru dolgih molekul izgubimo ločljivost verig po velikosti, saj se bodo vse gibale z enako hitrostjo. Ločevanje dolgih DNK molekul je ena izmed večjih omejitev in izziv gel elektroforeze.

4. POSTOPEK GEL ELEKTROFOREZE

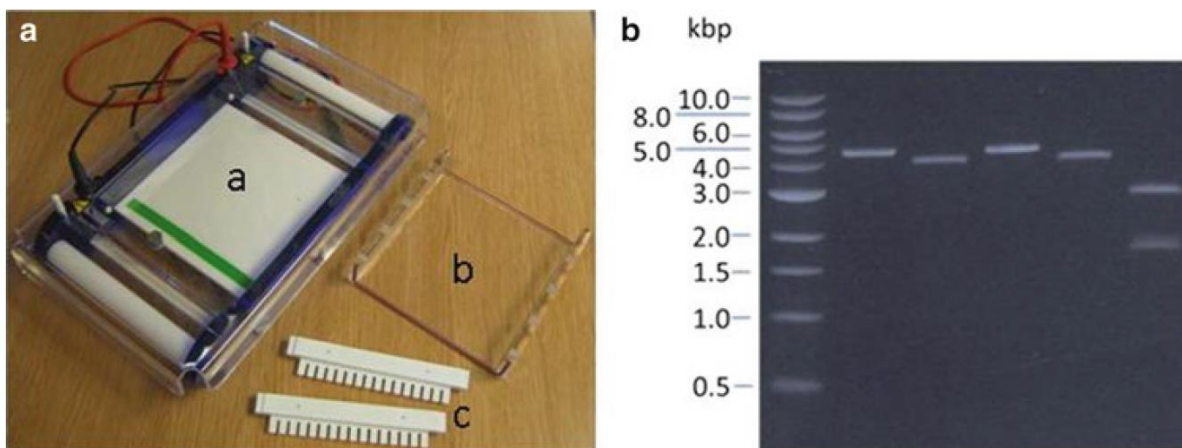
Gel elektroforeza je danes dobro uveljavljen in standardiziran laboratorijski postopek za analizo DNK. Postopek se med drugim uporablja v genetiki in medicini za sekvenciranje genomov, za identifikacijo patogenov in genetskih napak [5]. Gel elektroforeza je tudi del forenzičnega postopka iskanja prstnih odtisov DNK (angleško Genetic fingerprinting ali DNA testing). Ta tehnika omogoča identificiranje posameznikov in ugotavljanje sorodstvenih vezi med njimi izključno na podlagi zaporedja njihove DNK [8].

Za začetek moramo pripraviti gel. Običajno se uporablja agaroz ali poliakrilamidni gel. Med pomembnimi parametri pri izbiri gelov so kompatibilnost z molekulami, ki jih bomo ločevali, ponovljivost in enostavnost priprave ter velikost por.

Agaroz je polisaharid, ki je topen v vroči vodi in tvori gel, ko se shladi. Uporablja se za ločevanje relativno dolgih DNK molekul. Tipična velikost njegovih por je 200-500 nm. Poliakrilamid je fleksibilni nevtralni polimer, ki omogoča visoko ločljivost kratkih molekul DNK (od 5 do 500 bp [9]) in je primeren za sekvenciranje DNK, saj s to metodo lahko dosežemo zelo veliko ločljivost fragmentov in ločimo celo molekuli, ki se razlikujeta za 1 bazni par. Velikosti por akrilamidnega gela segajo od 5 do 100 nm. [1]

Gelu dodamo barvilo etidijev bromid, ki se veže na fragmente DNK. To barvilo pod UV svetlobo fluorescira in omogoča vizualizacijo fragmentov DNK. Vsak pas, ki vsebuje več kot 20 ng DNK postane jasno viden [10]. Drugi primeri barvil so še SYBR Green, SYBR Safe in Gel Red.

Pripravljen gel agaroze z barvilom vstavimo v plastično posodo, ki ima na vsaki strani po eno elektrodo, vse skupaj pa zalijemo s pufrom. DNK vzorce nanese v jamice v gelu, ki smo jih prej oblikovali s posebnim glavnikom (Slika 8a). Poleg vzorcev v eno jamico nanese še standard; lestvico DNK fragmentov z znanimi dolžinami. Ko požene električni tok, začnejo DNK segmenti potovati proti pozitivno nabiti elektrodi. Daljše molekule potujejo dlje časa, saj se soočajo z večjo silo trenja, ko potujejo skozi gel. In ker velikost molekul vpliva na njihovo mobilnost, manjši fragmenti pripotujejo bližje anodi kot daljši v danem časovnem intervalu. Po določenem času električni tok prekinemo in analiziramo ločene fragmente DNK. Gel osvetlimo z UV svetlobo in ga fotografiramo (Slika 8b). Z etidijevim bromidom obarvana DNK fluorescira rdeče-oranžno. Na gelu vidimo različne pasove, ki predstavljajo različne skupine molekul z različnimi molekulskimi masami. S pomočjo standarda na koncu lahko razberemo kako dolge segmenta DNK smo imeli v vzorcu. Velikost fragmentov se običajno podaja v »nukleotidih«, »baznih parih« ali »kb«-jih (tisoč baznih parov).



Slika 7: Oprema za Agarozna gel elektroforeza je standardiziran laboratorijski postopek za analizo DNK. (a) Standardna laboratorijska oprema za izvajanje gel elektroforeze. Črna-bela fotografija gela obarvanega z ethidijevim bromidom [ref].

Geli so običajno vli v obliki »plošče«, poznamo pa tudi kapilarno elektroforezo, ki postaja vedno bolj pomembna pri aplikacijah, kakršna je sekveniranje DNK [5].

5. ZAKLJUČEK

Gel elektroforeza je analitski postopek, ki omogoča ločevanje molekul po njihovi velikosti. Ta postopek se med drugim uporablja tudi za sevrčenje DNK molekul. Pri elektroforezi v prosti raztopini nabiti delci potujejo pod vplivom električnega polja proti nasprotno nabiti elektrodi. Okoli nabitega delca se v raztopini ustvari električni dvojni sloj. Tudi molekula DNK v raztopini disociira, a je zaradi Manningove kondenzacije njen naboj močno senčen. Električno polje deluje tako na gibanje delca, kot na gibanje ionskega oblaka okoli njega. V primeru tankega Debyevega sloja je gibanje delcev v prosti raztopini neodvisno od njihove velikosti, zato za ločevanje DNK po velikosti med elektrodi dodamo gel. Gibanje molekul DNK v gelu opišemo z reptacijskim modelom. Mobilnost je v primeru krajših molekul in šibkega električnega polja odvisna od dolžine DNK molekul. Postopek gel elektroforeze je danes standardiziran način analize molekul DNK.

6. VIRI

- [1] J.L. Viovy, *Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms*. Rev Mod Phys **72** 813-872 (2000).
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/DNA> (3.3.2015).
- [3] http://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing (3.3.2015).
- [4] http://www.austincc.edu/mlt/mdfund/mdfund_unit12objectives.html (3.3.2015).
- [5] S.Makovets, *DNA Electrophoresis* (Springer, New York, 2013).
- [6] Li Dongqing, *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* (Springer, New York, 2008).
- [7] W.B. Russel, *Brownian-Motion of small particles suspended in liquids*, Ann Rev Fluid Mech, **13**, 425 (1981).
- [8] http://sl.wikipedia.org/wiki/Iskanje_prstnih_odtisov_DNA (3.3.2015).
- [9] http://sl.wikipedia.org/wiki/Poliakrilamidna_gelska_elektroforeza_DNK (3.3.2015).
- [10] http://sl.wikipedia.org/wiki/Agarozna_gelska_elektroforeza (3.3.2015).