



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

Προγράμματα Επικαιροποίησης Γνώσεων Αποφοίτων ΑΕΙ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
“Ιατρική, φαρμακευτική, βιοτεχνολογία: Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία,
το περιβάλλον και τη διατροφή”.

Ενότητα 1: Βασικές βιοχημικές και βιοτεχνολογικές τεχνικές Α. Τεχνικές ανάλυσης DNA και πρωτεϊνών.

1. Ηλεκτροφόρηση βιομορίων.
2. Αποτύπωση και στυπώματα
3. RT-PCR
4. Μικροσυστοιχίες

Νίκος Μπαλατσός

1. Ηλεκτροφόρηση βιομορίων

Ηλεκτροφόρηση είναι η κίνηση ιόντων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Χρησιμοποιείται ευρέως για τον αναλυτικό διαχωρισμό βιολογικών μορίων. Οι νόμοι της ηλεκτροστατικής ορίζουν πως η ηλεκτρική δύναμη $F_{\eta\lambda}$ σε ένα ιόν με φορτίο q σε ένα ηλεκτρικό πεδίο ισχύος E δίνεται από τη σχέση

$$F_{\eta\lambda} = qE \quad (1)$$

Στην ηλεκτροφορητική κίνηση του ιόντος στο διάλυμα αντιτίθεται η δύναμη τριβής F_{τ} που δίδεται από τη σχέση

$$F_{\tau} = \nu f \quad (2)$$

όπου ν είναι ο ρυθμός μετακίνησης (ταχύτητα) του ιόντος και f ο συντελεστής τριβής. Ο f είναι ένα μέτρο της αντίστασης του διαλύματος στο κινούμενο ιόν και εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και τη κατάσταση διαλυτότητας του ιόντος, καθώς και από το ιξώδες του διαλύματος. Σε ένα σταθερό πεδίο, οι δυνάμεις αυτές εξουδετερώνονται και άρα

$$\begin{aligned} F_{\eta\lambda} &= F_{\tau} \\ &\text{ή} \\ qE &= \nu f \end{aligned} \quad (3)$$

έτσι ώστε κάθε ιόν κινείται με μια σταθερή χαρακτηριστική ταχύτητα. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα, μ , ορίζεται ως

$$\mu = \frac{\nu}{E} = \frac{q}{f} \quad (4)$$

Η προηγούμενη εξίσωση εφαρμόζεται μόνο σε ιόντα σε πολύ μεγάλη (άπειρη) αραιώση σε έναν μη αγώγιμο διαλύτη (nonconducting solvent). Σε υδατικά διαλύματα, μόρια όπως πρωτεΐνες, είναι καλυμμένες από ένα νέφος αντίθετα φορτισμένων ιόντων, που ασκούν επιπλέον ηλεκτρικό πεδίο μεγέθους και έχει ως αποτέλεσμα η εξίσωση 4 να δίνει μόνο κατά προσέγγιση την κινητικότητα. Παρόλα αυτά, η εξίσωση 4 προβλέπει πως τα μόρια στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, pI , έχουν μηδενική κινητικότητα. Επιπλέον, για τις πρωτεΐνες και άλλα μόρια με ιδιότητες οξέος-βάσεως, το ιονικό φορτίο, και άρα η ηλεκτροφορητική κινητικότητα, είναι συνάρτηση του pH [1].

Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, τα μόρια θα κατευθυνθούν προς τον πόλο αντίθετης με αυτά πολικότητας. Έτσι, ένα μείγμα μορίων διαφορετικού μεγέθους θα μετακινηθεί με διαφορετικές ταχύτητες και θα διαχωρισθεί.

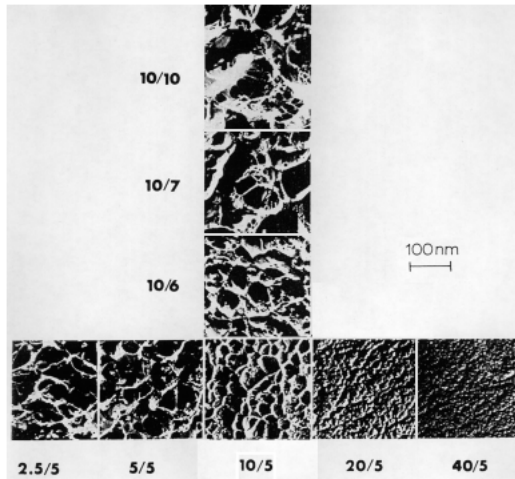
Ο πιο γνωστός τύπος ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό βιομορίων, όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες, είναι αυτός σε πηκτώμα (gel). Χρησιμοποιούνται ουσίες (αγαρόζη, ακρυλαμίδιο, οξική κυτταρίνη, κ.α.), που μπορούν να σχηματίσουν ένα ζελατινώδες υλικό κατάλληλο για διαχωρισμό βιομορίων. Ο κύριος ρόλος του πηκτώματος είναι να λειτουργεί ως πλέγμα, όπου επιτρέπει το διαχωρισμό μορίων με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Στο διαχωρισμό αυτό συμβάλλουν διάφοροι παράγοντες όπως η πυκνότητα του πηκτώματος, το μέγεθος των πόρων. Ο διαχωρισμός γίνεται κυρίως σε αποδιατακτικές συνθήκες με βάση το μέγεθος των βιομορίων. Επίσης μπορεί να γίνει και σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες (native) με βάση το μέγεθος και το φορτίο των βιομορίων (charge/mass). Άλλοι τύποι διαχωρισμού είναι η ισοηλεκτρική εστίαση (με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο σε μια βαθμίδωση pH), και ο διαχωρισμός σε δύο διαστάσεις (συνδυασμός φορτίου και μεγέθους).

Τα μόρια προς ανάλυση μπορούν να αναλυθούν στη φυσική τους μορφή (native) διατηρώντας στοιχεία της δομής τους, ή να μετουσιωθούν με τη χρήση μιας χημικής ουσίας που αποδιατάσει τη δομή τους. Για τα νουκλεϊκά οξέα ως μετουσιωτής χρησιμοποιείται κυρίως η ουρία. Για τις πρωτεΐνες ως μετουσιωτής χρησιμοποιείται το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).

Ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου

Στην ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), τα πηκτώματα δημιουργούνται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου. Ο πολυμερισμός επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από τη χημική διάσπαση του υπερθειϊκού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) ($S_2O_8^{2-} \rightarrow SO_4^{\cdot-}$), ή τη φωτοδιάσπαση της ριβοφλαβίνης παρουσία ιχνών O_2 . Σε κάθε περίπτωση, χρησιμοποιείται το TEMED (*N,N,N',N'*-τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη), ένας σταθεροποιητής ριζών, για να ξεκινήσει και να διατηρήσει την δημιουργία ελευθέρων ριζών από το APS. Έτσι, ένα ηλεκτρόνιο αποσπάται από το διπλό δεσμό C=C του ακρυλαμίδιου δημιουργώντας ρίζα ακρυλαμίδιου. Με τη σειρά της, η ρίζα αναζητά το χαμένο της ηλεκτρόνιο σε ένα γειτονικό μόριο ακρυλαμίδιου δημιουργώντας την αλυσίδα του πολυμερούς και διαδίδοντας την αντίδραση του πολυμερισμού. Λόγω του ότι το ακρυλαμίδιο σχηματίζει γραμμικά (ευθύγραμμο) πολυμερή, για τη δημιουργία διακλαδώσεων και το σχηματισμό τρισδιάστατου πλέγματος, χρησιμοποιείται μια ουσία (διακλαδωτής ή σταυροσυνδέτης, cross-linker), το δισακρυλαμίδιο (*N,N'*-μεθυλενοδισακρυλαμίδιο) (Εικόνα 1.1). Το πλέγμα αυτό έχει συγκεκριμένο μέγεθος πόρων, το οποίο καθορίζεται από τη συνολική συγκέντρωση ακρυλαμίδιου, %T [T = (g ακρυλαμίδιου + g δισακρυλαμίδιου)/100 ml διαλύματος], και τη σχετική συγκέντρωση του διακλαδωτή, %C [C = g δισακρυλαμίδιου/100 g (ακρυλαμίδιο + δισακρυλαμίδιο)]. Για παράδειγμα ένα πήκτωμα 8%, 19:1 (ακρυλαμίδιο : δισακρυλαμίδιο) σημαίνει πως έχει τιμή T = 8% και τιμή C = 5%. Όταν αυξάνεται η T, μειώνεται το άνοιγμα των πόρων, Το πήκτωμα δημιουργείται συνήθως ως μια λεπτή ορθογώνια πλάκα (slab), όπου τα διάφορα δείγματα μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα σε παράλληλες διαδρομές (Εικόνες 1.3, και 1.4). Το δείγμα προς ανάλυση αναμιγνύεται με μικρή ποσότητα πυκνού διαλύματος γλυκερόλης ή σουκρόζης, ώστε να μείνει συγκεντρωμένο στον πυθμένα της θέσης υποδοχής (well) και μην αναμιχθεί με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Αυτό βοηθά στο να μείνει το δείγμα όσο το δυνατό πιο συμπυκνωμένο, να μειωθεί η διάχυσή του και οι ζώνες των διαχωρισμένων πρωτεϊνών που θα εμφανιστούν να είναι πιο λεπτές και πιο εντοπισμένες. Κατόπιν, εφαρμόζεται σταθερή διαφορά δυναμικού για επαρκή χρόνο ώστε να διαχωρισθούν τα βιομόρια σε διακριτές ζώνες και να οπτικοποιηθούν με κατάλληλες μεθόδους (βλ. παρακάτω).

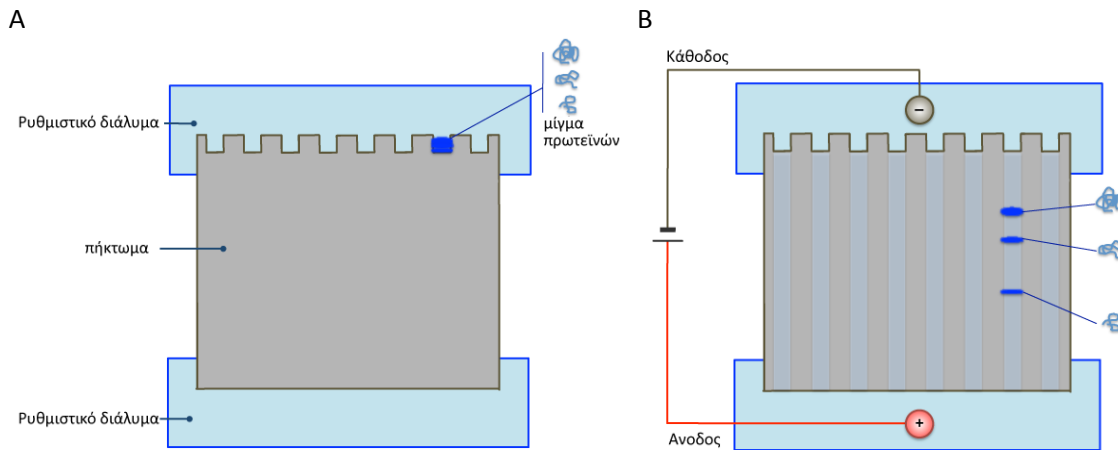
Εικόνα 1.1 Πολυμερισμός ακρυλαμίδιου και δισακρυλαμίδιου (*N,N'*-μεθυλενοδισακρυλαμίδιο) για δημιουργία σταυροδεσμών και πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου. Ο πολυμερισμός ξεκινά από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από τη χημική διάσπαση του APS, ($S_2O_8^{2-} \rightarrow SO_4^{\cdot-}$), παρουσία TEMED. Οι διακλαδώσεις σχηματίζονται



Εικόνα 1.2. Οι τιμές T και C καθορίζουν το μέγεθος των πόρων ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου. Στο διπλανό σχήμα φαίνονται φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου σε διαφορετικές T/C (π.χ. 10/10 σημαίνει T = 10, C = 10). Το ελάχιστο μέγεθος πόρων παρατηρείται σε C = 5%. (Σχήμα βάσει [3])

$$\%T = (g \text{ ακρυλαμίδιο} + g \text{ δισακρυλαμίδιο}) / 100 \text{ ml διαλύματος}$$

$$\%C = g \text{ δισακρυλαμίδιο} / 100 g (\text{ακρυλαμίδιο} + \text{δισακρυλαμίδιο})$$

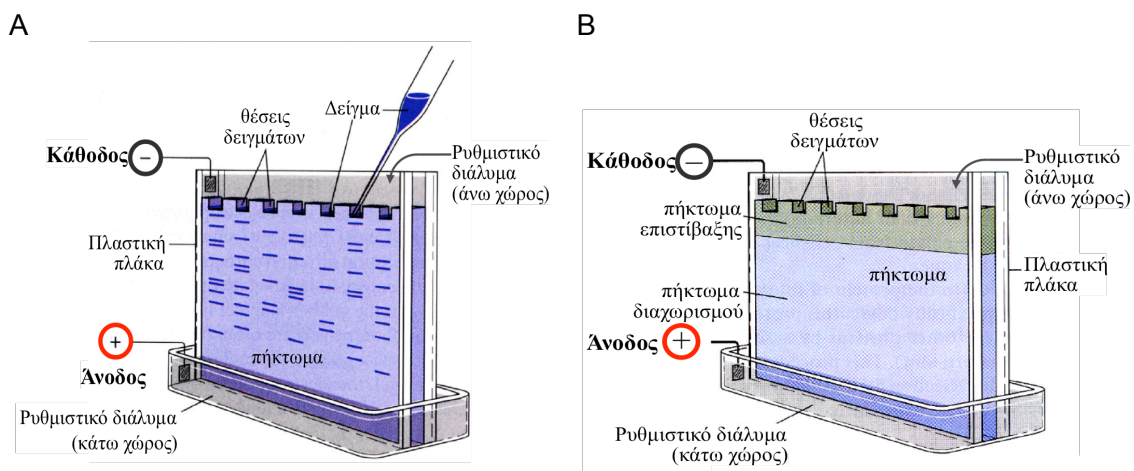


Εικόνα 1.3. Κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. A. Το μίγμα πρωτεϊνών φέρεται σε υποδοχή, ενώ το πήκτωμα έρχεται σε επαφή με δύο χώρους που περιέχουν κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. B. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, οι πρωτεΐνες κινούνται κατακόρυφα και διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους μέγεθος.

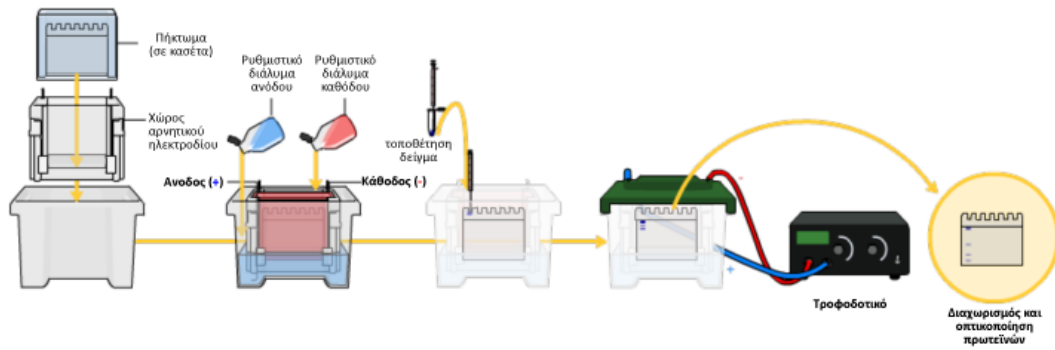
Ασυνεχής ηλεκτροφόρηση

Η στενότητα των ζωνών της προηγούμενης μεθόδου καθορίζει τη διακριτική ικανότητα των διαχωρισμών: όσο «παχύτερη» η ζώνη, τόσο αυξάνει η πιθανότητα να βρίσκονται περισσότερα διαφορετικού αλλά παραπλήσιου μεγέθους βιομόρια στην ίδια ζώνη, και άρα δυσκολεύεται η αναλυτική ικανότητα. Οι ζώνες γίνονται αρκετά πιο λεπτές με μια ευφυή τεχνική, την *ασυνεχή ηλεκτροφόρηση* (discontinuous pH ή disk electrophoresis), η οποία χρησιμοποιεί δύο πηκτώματα και διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα. Το συνολικό πήκτωμα απαρτίζεται από δύο πηκτώματα: το πήκτωμα διαχωρισμού (running ή resolving gel) και το πήκτωμα επιστίβαξης (stacking ή spacer gel) (Σχήμα 1.4 B). Η ασυνεχής ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες με τη χρήση SDS για ανάλυση πρωτεϊνών, γνωστή ως SDS-PAGE. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, που αφενός «γραμμικοποιεί» τα μόρια διασπώντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς, αφετέρου φορτίζει αρνητικά όλα τα μόρια. Στις περισσότερες πρωτεΐνες, η πρόσδεση του SDS στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δημιουργεί μια ομοιόμορφη αναλογία φορτίου/μάζας, που συμβάλλει στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους. Το pH του πηκτώματος ανάλυσης και του ρυθμιστικού του διαλύματος (στον κατώτερο χώρο) είναι κατά περίπου δύο μονάδες μεγαλύτερο από αυτό του πηκτώματος επιστίβαξης και του διαλύματος του δείγματος. Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος επιστίβαξης είναι σχετικά μικρό (T ~ 5%), ώστε να διευκολύνεται η κίνηση όλων των βιομορίων από τους πόρους του. Το pH του

ρυθμιστικού διαλύματος στον άνω χώρο της συσκευής (το οποίο πρέπει να περιέχει ένα ασθενές οξύ, συνήθως γλυκίνη, $pK_2=9.78$) ρυθμίζεται κοντά σε αυτό στον κατώτερο χώρο. Όταν εφαρμόζεται ρεύμα, τα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος κινούνται στο πήκτωμα επιστίβαξης καθώς τα ιόντα του ρυθμιστικού του πηκτώματος επιστίβαξης κινούνται μπροστά τους. Έτσι, τα ιόντα του ρυθμιστικού του άνω χώρου, συναντούν ένα pH που είναι αρκετά χαμηλότερο από την δική τους pK . Έτσι αποκτούν την αφόρτιστη μορφή τους (ή, στην περίπτωση της γλυκίνης τη μορφή του διϊόντος –zwitterion) και ακινητοποιούνται (αφού ένα αφόρτιστο σωματίδιο σε ένα ηλεκτρικό πεδίο δεν κινείται ούτε προς την άνοδο ούτε προς την κάθοδο). Αυτό προκαλεί μια έλλειψη μεταφορέων φορτίων, δηλαδή υψηλή ηλεκτρική αντίσταση R , στην περιοχή αυτή και εξαιτίας της απαίτησης για σταθερή ένταση ρεύματος I , σε όλο το το ηλεκτρικό κύκλωμα, οδηγεί, (σύμφωνα με το νόμο του Ohm, $E = IR$) σε υψηλή αύξηση τοπικά της έντασης του πεδίου (και της θερμοκρασίας του πηκτώματος). Ως απόκριση σε αυτή την αύξηση της έντασης του πεδίου, τα ανιόντα των μακρομορίων κινούνται γρήγορα μέχρις ότου φτάσουν στην περιοχή όπου βρίσκονται τα ρυθμιστικά ιόντα του διαλύματος επιστίβαξης, και εκεί επιβραδύνονται γιατί εκεί δεν υπάρχει έλλειμα ιόντων. Αυτό το φαινόμενο προκαλεί τα ιόντα μακρομορίων να προσεγγίζουν το πήκτωμα διαχωρισμού ως πολύ λεπτές ζώνες (πάχους ~ 0.01 mm) που στιχίζονται ανάλογα με την κινητικότητα τους και στιβάζονται ανάμεσα στα κινούμενα ιόντα του άνω χώρου και αυτών του πηκτώματος επιστίβαξης. Καθώς τα μακρομόρια εισέρχονται στο πήκτωμα διαχωρισμού, επιβραδύνονται ως συνέπεια του μεγέθους τους και το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος. Επίσης, τα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος του άνω χώρου εισέρχονται και αυτά στο πήκτωμα και παίρνουν την πλήρως φορτισμένη τους μορφή (λόγω του υψηλότερου pH του πηκτώματος διαχωρισμού), και έτσι κινούνται πιο γρήγορα και προσπερνούν τα πολύ μεγαλύτερα μακρομόρια (που κινούνται πλέον σε μορφή ζωνών). Από το σημείο αυτό ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός προχωρεί κανονικά. Έχει όμως επιτευχθεί η συμπίεση των ζωνών των μακρομορίων γεγονός που αυξάνει πάρα πολύ τη διακριτική ικανότητα του διαχωρισμού τους.



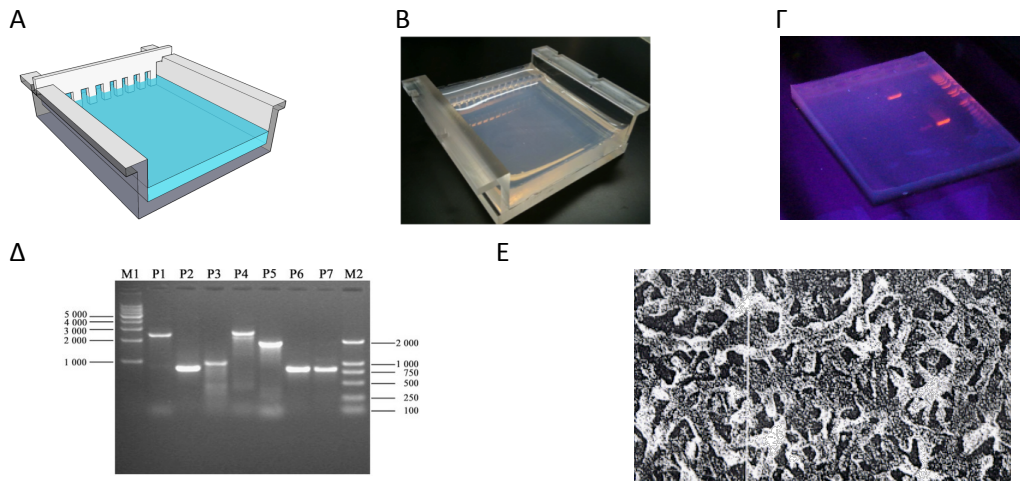
Εικόνα 1.4. Κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση. Α. Συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης πηκτώματος. Τα δείγματα τοποθετούνται σε θέσεις υποδοχής (wells) στην κορυφή του πηκτώματος και ηλεκτροφορούνται σε παράλληλες διαδρομές. **Β. Διάγραμμα συσκευής ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης.** Από Voet & Voet. Biochemistry 2nd Edition.



Εικόνα 1.5. Διάταξη και βήματα ηλεκτροφόρησης. Το ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου (ή άνω χώρου στο προηγούμενο σχήμα) βρίσκεται στην κασέτα με το πήκτωμα. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μπορεί να είναι ίδιας σύστασης ή διαφορετικής (στην ασυνεχή ηλεκτροφόρηση). Βάσει [4]

Πηκτώματα αγαρόζης

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση μακρομορίων μεγάλου μοριακού βάρους (>200 kDa), όπως είναι συνήθως μόρια DNA, χρειάζεται πηκτώματα με μεγάλους πόρους, δηλαδή μικρές τιμές T (<2.5%). Τόσο μικρές τιμές T όμως δίνουν πηκτώματα που είναι πολύ μαλακά και πολύ ευαίσθητα για να χειρισθούν. Η δυσκολία αυτή αντιμετωπίζεται με χρήση αγαρόζης, ένα φυσικό πολυμερές που παράγεται από ένα συγκεκριμένα είδη φυκιών¹. Η αγαρόζη αναμιγνύεται σε κατάλληλο διάλυμα και όταν θερμανθεί και ακολούθως αφηθεί να ψυχθεί σχηματίζει πηκτώματα μέσω δεσμών υδρογόνου. Σημειώνεται πως τα πηκτώματα αγαρόζης απαρτίζονται από πολυμερή αγαρόζης, που όμως δεν έχουν προκύψει από αντίδραση χημικού πολυμερισμού, όπως του ακρυλαμίδιου. Τα πηκτώματα αγαρόζης είναι εύκολα στη δημιουργία και χρησιμοποιούνται εκτενώς στο διαχωρισμό και μελέτη τμημάτων DNA. Το DNA μπορεί να οπτικοποιηθεί με χρήση χρωστικών ουσιών σε υπεριώδες φως, ενώ το ίδιο το DNA μπορεί να εκχυλισθεί εύκολα από το πήκτωμα της αγαρόζης (αφού εντοπιστεί η θέση του) για περαιτέρω μελέτες. Τα περισσότερα πηκτώματα που χρησιμοποιούνται έχουν συγκέντρωση αγαρόζης 0.7 – 2 % (% w/v, g αγαρόζης /100 g διαλύματος).



Εικόνα 1.6. Πήκτωμα και ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Α. Σχεδιάγραμμα διάταξης για δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης (γαλάζιο) για οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Το «χτενάκι» δημιουργεί τις υποδοχές (wells) όπου θα μεταφερθεί το προς ανάλυση δείγμα [5]. Β. Ένα πήκτωμα αγαρόζης στο δίσκο του με τις υποδοχές σχηματισμένες [6]. Γ. Πήκτωμα αγαρόζης όπου έχουν αναλυθεί δείγματα DNA. Το DNA έχει προσδέσει τη χρωστική θρωμιούχο αιθίδιο και δείχνει τις χαρακτηριστικές φωτεινές ζώνες όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως [7]. Δ. Ανάλυση δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (διαδρομές P1-P7). Οι αριθμοί δεξιά και αριστερά είναι δείκτες μεγέθους αλληλουχιών DNA (σε ζεύγη βάσεων, bp), όπως έχουν αναλυθεί στις διαδρομές M1 και M2 [8]. Ε. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πηκτώματος αγαρόζης 2%. Οι ίνες έχουν διάμετρο περίπου 10 nm (100 Å).

¹ Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης. Το μονομερές είναι ένας δισακχαρίτης από D-γαλακτόζη και 3,6-ανδρο-L-γαλακτοπυρανόζη.

Βιβλιογραφία

1. Voet D. and Voet J. (2004) *Biochemistry*. John Wiley and sons, Inc.,
2. <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-19.jpg>
3. <http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/PAA.gif>
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>
5. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose_Gel_wCi,
_in_a_Gel_Tray_\(Front,_angled_view\)_-_SketchUp.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose_Gel_wCi,_in_a_Gel_Tray_(Front,_angled_view)_-_SketchUp.png)
6. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Two_percent_Agarose_Gel_in_Borate_Buffer_cast_in
_a_Gel_Tray_\(Front_angle\).jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Two_percent_Agarose_Gel_in_Borate_Buffer_cast_in_a_Gel_Tray_(Front_angle).jpg)
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:AgarosegelUV.jpg>
8. http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/5-10.1186_1471-2164-10-84-1