

Analiza DNA fragmenata metodom agarozne gel elektroforeze

Mak, Maria Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:939513>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Maria Karla Mak

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Analiza DNA fragmenata metodom agarozne gel elektroforeze

Završni rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Maria Karla Mak

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Analiza DNA fragmenata metodom agarozne gel elektroforeze

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Sonja Petrović, mentorica
2. prof. dr. sc. Sonja Vila, članica
3. doc. dr. sc. Sunčica Kujundžić, članica

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo
Maria Karla Mak

Završni rad

Analiza DNA fragmenata metodom agarozne gel elektroforeze

Sažetak: Agarozna gel elektroforeza je migracija nabijenih čestica na gelu, uslijed djelovanja električnog polja. Uobičajena je laboratorijska tehnika za odvajanje i analizu fragmenata DNA i ostalih biomolekula na temelju njihove veličine. Genomska DNA je ukupan genetički materijal jednog organizma i nalazi se u jezgrama stanica. Cilj ovog rada bio je opisati i primijeniti metodu agarozne gel elektroforeze te utvrditi veličine fragmenata DNA molekule. Pripremljene su četiri vrste gelova koncentracija: 0,8%, 1%, 2% i 3%. Prema dobivenim rezultatima utvrđeno je da su fragmenti genomske DNA veći od PCR fragmenata i sukladno s tim je zaključeno da manji fragmenti putuju brže i dalje od velikih fragmenata, što je bilo i očekivano. Zaključno, za analizu većih fragmenata genomske DNA optimalno je koristiti gel koncentracije 1% i manje, dok se za PCR fragmente najčešće koristi gel koncentracije od 2 do 3%, optimalno 2,5%.

Ključne riječi: agarozna gel elektroforeza, genomska DNA, PCR

21 stranica, 2 tablice, 14 slika, 17 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production
Maria Karla Mak

BSc Thesis

DNA fragment analysis by agarose gel electrophoresis method

Summary: Agarose gel electrophoresis is the migration of charged particles on the gel, due to the influence of applied electric field. It is a common laboratory technique for separating and analyzing DNA fragments and other biomolecules based on their size. Genomic DNA is a total genetic material of an organism and it's found in the cell nuclei. The aim of this research was to describe and apply the agarose gel electrophoresis method and to determine the sizes of DNA molecule fragments. Four gel concentrations were prepared: 0.8%, 1%, 2% and 3%. According to the obtained results, it was determined that genomic DNA fragments are larger than PCR fragments and accordingly it was concluded that smaller fragments travel faster than the large fragments, which was expected. In conclusion, for the analysis of larger fragments of genomic DNA, it is optimal to use a gel concentration of 1% or less, while for PCR fragments, gel concentration of 2 to 3% is usually used, optimally 2,5%.

Key words: electrophoresis, agarose, genomic DNA, PCR

21 pages, 2 tables, 14 figures, 17 references

BSc Thesis is archived: in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. MATERIJALI I METODE	3
2.1. Biljni materijal	3
2.2. Laboratorijski pribor, kemikalije i uređaji.....	5
2.3. Metoda elektroforeze u agaroznom gelu	6
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	14
4. ZAKLJUČAK.....	19
5. POPIS LITERATURE.....	20

1. UVOD

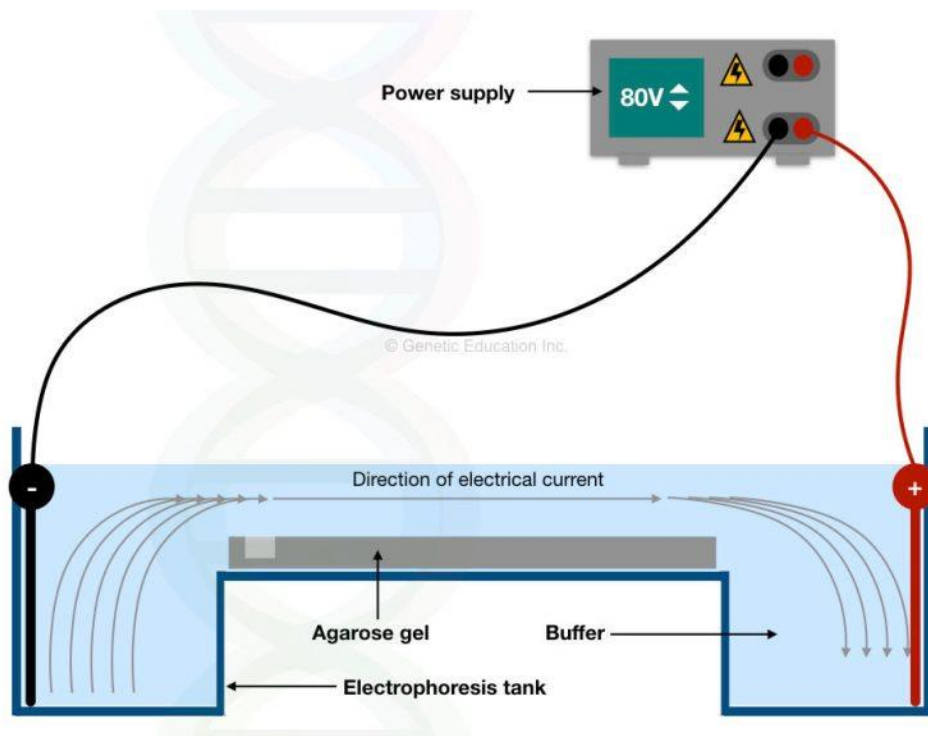
Elektroforeza je proces migracije nabijenih čestica kroz medij uslijed djelovanja električnog polja (Piljac, 2006.).

Agarozna gel elektroforeza je laboratorijska metoda za odvajanje i analizu makromolekula i nukleinskih kiselina na temelju veličine njihovih fragmenata. H. V. Thorne je u svojim ranim radovima uspio odvojiti DNA poliom virusa iz DNA stanice domaćina putem elektroforeze, a zbog nezainteresiranosti tadašnje znanstvene zajednice metoda agarozne gel elektroforeze doživjela je procvat između 1972. i 1975. godine (Kumar i sur. 2021.). Identificiranje i razdvajanje različitih biomolekula jedan je od primarnih ciljeva elektroforeze. Agaroznom gel elektroforezom vrše se brojna istraživanja u genetici, biokemiji, molekularnoj biologiji i drugima. Neki od najvažnijih primjera uporabe ove metode su: analiza DNA i RNA, pročišćavanje DNA fragmenata, genetski inženjering, DNA „fingerprinting“, analiza proteina, analiza okolišne DNA (<https://microbiologynote.com/>). Elektroforeza DNA u agaroznom gelu može se provoditi u nativnim uvjetima koji podrazumijevaju kretanje DNA u dvolančanom obliku te u denaturirajućim uvjetima pri čemu jednolančani oblik DNA prolazi kroz gel. Standardna elektroforeza, u nativnim uvjetima, podrazumijeva upotrebu električnog polja stalne jakosti i smjera, pri čemu je moguće razdvojiti molekule DNA duljine od 50 pb do 50 kpb, dok se za kraće molekule DNA koristi elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (Ambriović Ristov, 2007.)

Genomska DNA je ukupan genetički materijal jednog organizma. Nalazi se u jezgri stanica te je organizirana u proteinske komplekse koji se nazivaju kromosomi. DNA je evolucijski odabrana kao „molekula života“ zbog iznimne stabilnosti i zbog mogućnosti preciznog i točnog kopiranja DNA koja omogućuje reprodukciju i nasljeđivanje, odnosno prijenos genetskih svojstava s roditelja na potomstvo. DNA sadržava veliku količinu genetskih informacija; sintezom specifičnih proteina, koji su određeni redoslijedom baza, omogućava se organizmima da kontroliraju svoje metaboličke procese, razvoj i funkciju (<https://www.qiagen.com/>). Analize DNA podrazumijevaju prethodno izdvajanje genomske DNA iz nekog biljnog ili životinjskog organizma ili iz bakterija. Metode za izdvajanje biljne genomske DNA ovise o vrsti same biljke te vrsti daljnjih analiza, pa je tako moguće izolirati DNA iz cijele biljke, sjemena ili iz staničnih organela kao što su mitohondriji ili kloroplasti. Izdvajanje genomske DNA iz biljnog tkiva temelji se većinom na izdvajanju iz male količine biljnog materijala te je takav uzorak prikladan za različita istraživanja velikog broja uzoraka.

Jedna od najčešće korištenih metoda je tzv. CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*) modificirana metoda prema Doyle i Doyle (1990) metodi koja rezultira vrlo čistom DNA. Analiza DNA se sastoji, od niza metoda neke od njih su digestija genomske DNA pomoću restrikcijskih endonukleaza (Loenen i sur., 2014) ili umnažanje nekog odsječka DNA. Lančana reakcija polimerazom (PCR – *Polymerase chain reaction*) je laboratorijska metoda umnažanja određenog segmenta DNA koji se kasnije može dalje istraživati. Metoda PCR uključuje korištenje takozvanih početnica, odnosno kratkih sintetičkih fragmenata DNA za odabir određenog segmenta genoma DNA, koji se želi umnožiti (<https://www.genome.gov/>).

Cilj ovog istraživanja je opisati i primijeniti metodu agarozne gel elektroforeze te utvrditi veličine fragmenata DNA molekule.



Slika 1. Shema elektroforeze (<https://geneticeeducation.co.in>)

2. MATERIJAL I METODE

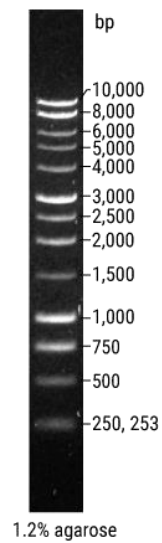
2.1. Biljni materijal

U ovom istraživanju korištena je biljna genomska DNA pšenice i graha, te DNA fragmenti nakon lančane reakcije polimerazom (PCR – *Polymerase chain reaction*).

Genomska DNA je ukupan genetički materijal jednog organizma, u njoj se nalaze sve upute za izgradnju, održavanje te izvršavanje bioloških funkcija. Kod biljaka, genomska DNA se nalazi u jezgrama stanica a, osim u jezgri, mala količina može se nalaziti i u drugim organelima kao što su kloroplasti i mitohondriji jer oni imaju vlastite setove gena te aktivno sudjeluju u metaboličkim procesima. Ovisno o vrsti biljke, DNA može biti različitih veličina. Zbog svoje veličine, molekule genomske DNA su u većini organizama organizirane u DNA-proteinske komplekse koji se nazivaju kromosomi. Osnovnu strukturu molekule DNA čine nukleotidi. Svaki nukleotid je sastavljen od dušične baze (adenin, citozin, gvanin i timin), šećera (deoksiriboze) i fosfatne skupine. Upravo zbog fosfatnih skupina između svake deoksiriboze, molekula DNA je negativno nabijena nukleinska kiselina. Spajanjem dušičnih baza vodikovim vezama, adenina i timina odnosno gvanina i citozina, stvara se dvostruka spiralna uzvojnica DNA. Molekula DNA iznimno je stabilna zbog nekoliko razloga. Dvije paralelne niti koje spajaju dušične baze u konačnici rezultiraju strukturom dvostruke spiralne uzvojnice. One omogućuju organizmu da lako pristupi DNA te ju replicira, a ujedno služe kao zaštita genetske informacije. Povezivanje baza relativno jakim vodikovim vezama te prisutnost Van der Waalsove sile (privlačne sile) između atoma u molekuli dodatno pridonose stabilnosti molekule. Vrlo je važno prisustvo enzima koji popravljaju i štite DNA, jer oni svojim djelovanjem također sudjeluju u održavanju stabilnosti, te se nazivaju još i molekularni „popravljajući“ (<https://www.britannica.com/>).

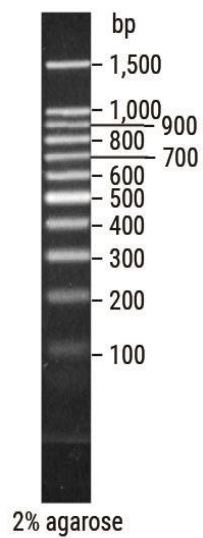
Uzorci genomske DNA te fragmenata nakon PCR reakcije pšenice i graha preuzeti su iz DNA kolekcije uzoraka Katedre za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo. Izolacija genomske DNA iz mladih listova pšenice i graha provedena je prema CTAB metodi, pri čemu je izolirana DNA otopljena u 100 µl TE (Tris-EDTA) pufera. Korišteni su fragmenti DNA dobiveni amfikacijom mikrosatelitnih početnica (SSR - Simple Sequence Repeat) nakon PCR reakcije na uzorcima pšenice i graha s očekivanim produktima amplifikacije od 150 i 200 pb (parova baza).

Navedena genomska DNA i PCR fragmenti su bili uspoređeni sa standardnom DNA, odnosno lambda DNA (λ DNA), koncentracije 100 i 200 ng/ μ l te DNA ljestvama standardne duljine parova baza od 1 kpb i 100 pb (slika 2 i 3).



Slika 2. DNA ljestve duljine 1 kpb, Promega

(Izvor: <https://worldwide.promega.com/>)



Slika 3. DNA ljestve duljine 100 pb, Promega

(Izvor: <https://worldwide.promega.com/>)

2.2. Laboratorijski pribor, kemikalije i uređaji

U Tablici 1 je popis laboratorijskog pribora kemikalija i reagenasa te uređaja koji su korišteni u ovom istraživanju.

Tablica 1. Laboratorijski pribor, kemikalije i uređaji

Pribor	Erlenmeyerova tikvica 250 ml Menzura od 100 ml Mikropete različnog volumena Nastavci za mikropipete Tubice od 0,5 ml Stalak za tubice Papirnati ubrusi Kadica za izlijevanje gela (7 x 10 cm) Češalj s osam jažica Krep traka
Kemikalije	1 x TBE pufer Agaroz u prahu (SeaKem®) Boja za nanošenje uzoraka (Blue/Orange Loading Dye, 6X, Promega) Standardi za veličinu uzoraka (BenchTop 100bp DNA Ladder i 1kb DNA Ladder Promega) Boja za nukleinske kiseline (Olerup SSP® GelRed™)
Uređaji	Laboratorijska vaga (Mettler Toledo) Mikrovalna pećnica Vrtložna miješalica (vortex) Uređaj za elektroforezu (Sub-Cell® GT, Bio-Rad) Izvor napajanja (PowerPac™, Bio-Rad) Digitalni uređaj za snimanje gelova pod UV svjetlom: G:BOX F3, Syngene

Sav laboratorijski pribor je unaprijed pripremljen. Erlenmayer tikvice od 250 ml te menzura od 100 ml su prethodno sterilizirane, kao i nastavci za pipete te tubice od 0,5 ml.

2.3. Metoda elektroforeze u agaroznom gelu

Kretanje električki nabijenih čestica u otopini, pod utjecajem električnog polja, naziva se elektroforeza. Za uspostavljanje električnog polja u mediju, služe pozitivna (anoda) i negativna elektroda (katoda). Postoje razne metode elektroforeze, kao što su: elektroforeza u slobodnoj otopini, elektroforeza u otopini na nosaču, elektroforeza u homogenom poliakrilamidnom gelu uz homogeni pufer, elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz diskontinuirane uvjete, elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti aditiva, elektroforeza na agaroznom gelu, dvodimenzionalna (2D) elektroforeza visoke rezolucije, elektroforeza u kapilari (Piljac, 2006.).

U ovom eksperimentu je korištena elektroforeza na agaroznom gelu koja je jedna od najčešće korištenih i uobičajenih tehnika za odvajanje i analizu ne samo nukleinskih kiselina već i drugih biomolekula na temelju njihovog naboja i veličine. Najveću primjenu ima u području genetike, molekularne biologije, biokemije i imunologije. Agaroz je pročišćeni polisaharid dobiven iz agara. Agar je biopolimer koji ima vrlo veliku komercijalnu i znanstvenu vrijednost, a ekstrahiran je iz crvenih morskih algi (rodovi *Gellidium* i *Gracilaria*). Agar je jedna od prvih tvari koja se koristila u razdvajanju proteina i kao medij za mikrobiološke podloge (<https://glossary.periodni.com>). Pročišćavanjem, agara odnosno uklanjanjem agaropektina, dobije se agaroz. Otapanjem praha agaroze u nekoj otopini (vodi ili puferu) pri vrlo visokoj temperaturi (95 - 100°C ovisno o otapalu) te hlađenjem nastaje agarozni gel. Hlađenjem se umrežavaju molekule, nastaje vlaknasta polimerna struktura između čijih vlakana su pore u kojima se zadržava voda, odnosno otopina nekog elektrolita, te tako veličina pora ovisi o koncentraciji agaroze (Piljac, 2006.).

Tijekom rada u laboratoriju korištena je standardna zaštitna oprema: laboratorijska kuta, zaštitne rukavice i zaštitne naočale. Prvo je pripremljen 1x TBE pufer (koji sadrži 0,09 M Tris-borat i 0,01 M EDTA) dobiven razrjeđivanjem „stock“ otopine 10x TBE koja je priređena otapanjem 108 g Tris baze, 55 g borne kiseline i 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8 u destiliranoj vodi, tako da konačni volumen otopine iznosi 1L). U menzuru (maksimalnog volumena 100 mL) odmjereno je 60 mL 1x TBE pufera što je ujedno i volumen kadice (slika

4). Volumen kadice je bilo potrebno izračunati kako bi bilo moguće odvagati agarozu za različite koncentracije gelova. U ovom istraživanju pripremljeni su agarozni gelovi sljedećih koncentracija: 0,8%, 1%, 2% i 3%.

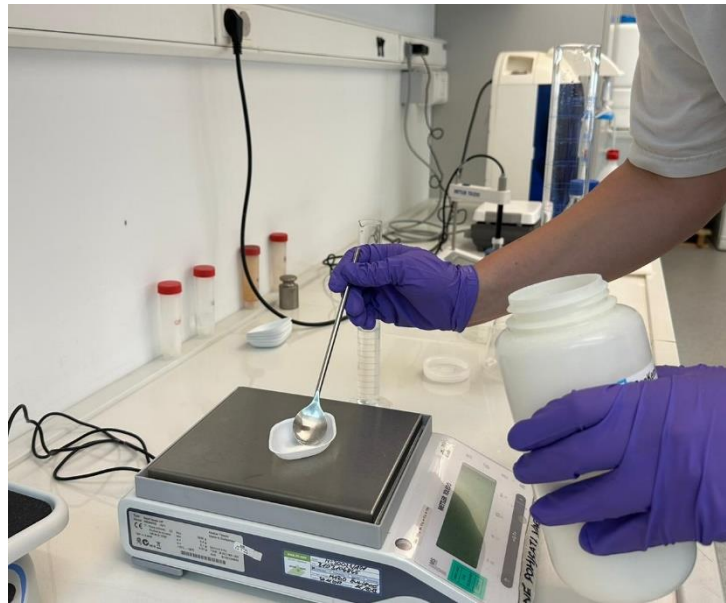


Slika 4. Mjerenje količine 1xTBE pufera

(autor: M.K. Mak)

U sljedećem su koraku na laboratorijskoj vagi izvagane različite količine agaroze sukladno različitim koncentracijama gela. Tako je za 0,8%-tni agarozni gel izvagano 0,48 g agaroze, za 1%-tni gel 0,6 g agaroze, za 2%-tni gel 1,2 g agaroze te za 3% gel 1,8 g agaroze (slika 5).

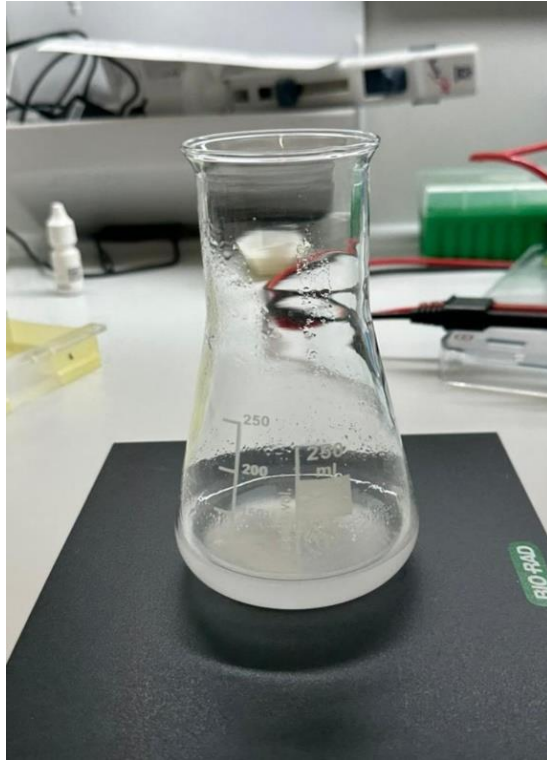
Pufer i agarozu su zatim pomiješani u Erlenmeyerovoj tikvici (slika 6). Agarozu nije moguće otopiti u puferu pri sobnoj temperaturi, otopina je zagrijana u mikrovalnoj pećnici. Otopina se zagrijavala u intervalima od 30 sekundi u ukupnom trajanju od 2 minute. Između pojedinih intervala, tikvica je uklanjana iz mikrovalne pećnice kako bi se smjesa dobro promiješala. Navedeni je postupak ponovljen nekoliko puta, sve dok se agarozu nije potpuno otopila. Zatim je otopina ohlađena do temperature od oko 50°C te je u smjesu dodano dvije kapi za boje za nukleinske kiseline (Olerup GelRed).



Slika 5. Mjerenje mase agaroze

(autor: M.K. Mak)

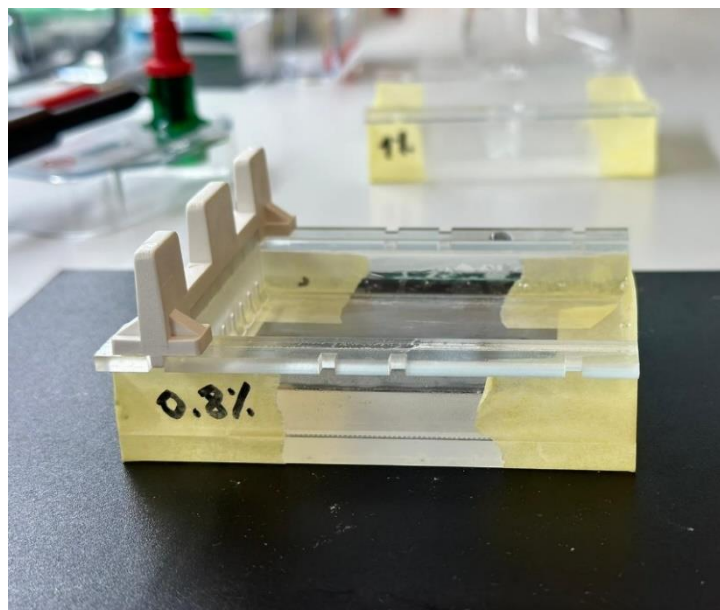
Boja Olerup SSP® GelRed™ je stabilna, okolišno prihvatljiva i sigurna fluorescentna boja za nukleinske kiseline osmišljena kako bi potpuno zamijenila etidij bromid koji je potencijalno mutagen. Olerup boja se interkalira između baza pri čemu je moguće vidjeti uzorke pod UV svjetlom, odnosno omogućava bojanje dvolančane i jednolančane DNA i RNA pri analizi u agaroznim i poliakrilamidnim gelovima. Kao što je prethodno navedeno, temperatura otapanja agaroze je blizu ključanja, no temperatura želiranja se kreće između 37°C i 43°C, pri čemu je bilo jako važno da temperatura izlivanja u kalupe ne bude niža od navedenih vrijednosti. Jako je važno da koncentracija gela bude usklađena s veličinom analiziranog fragmenta kako bi se postigli najbolji rezultati



Slika 6. Otopina 1xTBE pufera i agaroze

(autor: M.K. Mak)

U sljedećem je koraku rashlađena otopina izlivena u pripremljene kalupe za gel, nastavkom za pipete su pažljivo odstranjeni mjehurići te su u otopinu gela, koja je još tekućem stanju, stavljeni češljici za osam jažica. Nakon polimerizacije, odnosno hlađenja gela, (slika 7) češljici su pažljivo izvađeni okomito prema gore, kako se ne bi narušila struktura jažice i samoga gela. Volumen jažica u ovom istraživanju bio je 10 μ L.



Slika 7. Polimerizacija gela

(autor: M.K. Mak)

Sastavljena je jedinstvena shema slaganja uzoraka u jažice (tablica 2) za sve pripremljene gelove. Uzorci su pripremljeni u prethodno sterilizirane tubice od 0,5 μ L koje su poslagane u stalak.

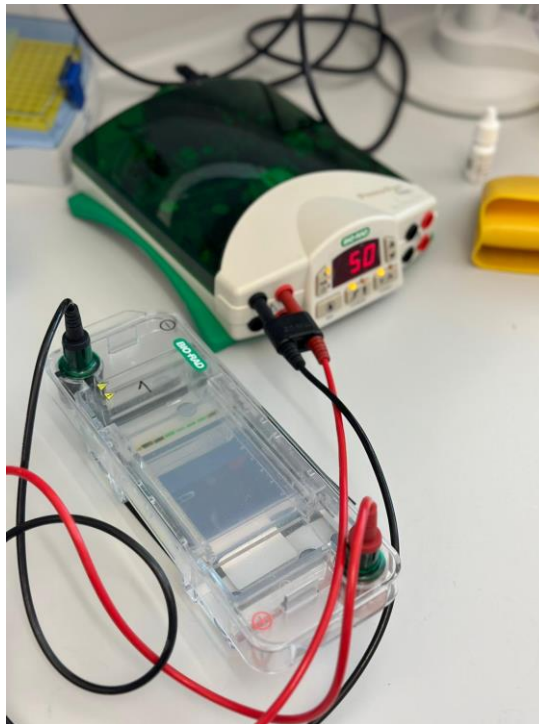
Tablica 2. Shema slaganja uzoraka u gel

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
DNA standard od 1 kbp	genomska DNA pšenice	genomska DNA graha	λ DNA 100	λ DNA 200	PCR uzorak pšenice	PCR uzorak graha	DNA standard od 100 bp

U uzorke od broja 1 do broja 5 umiješana je boja za nanošenje i praćenje uzoraka te destilirana voda u odgovarajućim omjerima (uzorak 1: boja 1: voda 3). Boja (Blue/Orange Loading Dye) se sastoji od 0,4% narančaste (G), 0,03% bromfenol plave 0,03% ksilen cijanol (FF), 15% Ficoll® 400, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) i 50mM EDTA (pH 8.0). Ova boja se najčešće koristi pri nanošenju uzoraka u jažice jer sadrži glicerol, polimer visoke molekularne mase koji dodaje viskoznost i težinu uzorcima kako ne bi isplivali iz jažica tijekom nanošenja te omogućava taloženje uzorka na dno jažice. Navedene boje služe kao

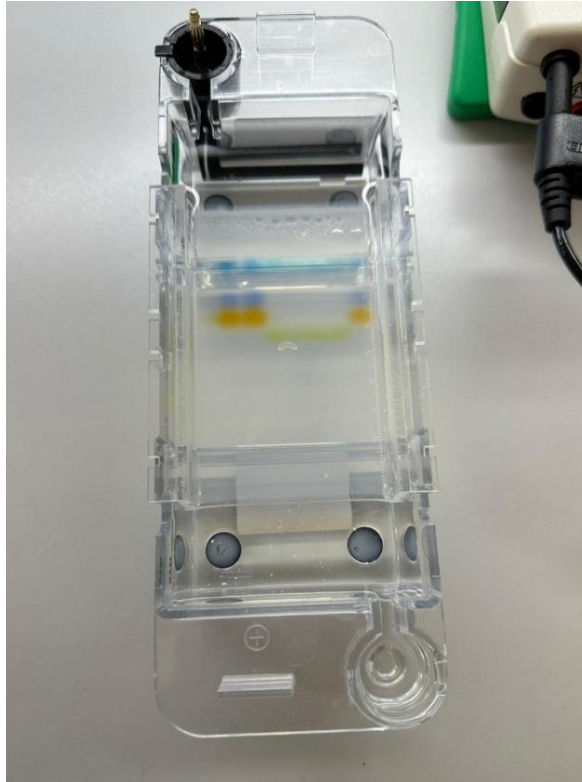
pokazatelji kretanja uzoraka kroz gel pri čemu u gelovima od 0,5 do 1,4% agaroznog gela tamnozeleni migrira otprilike brzinom od 4kb, bromfenol plava oko 300bp i narančasta oko 50 bp (<https://worldwide.promega.com/>). Uzorci pod brojevima 6, 7 i 8 su unaprijed obojani odgovarajućim bojama za nanošenje na gel.

Gel je zatim stavljen u uređaj za elektroforezu (Sub-Cell® GT, Bio-Rad) te je u njega dodana odgovarajuća količina 1xTBE pufera, tako da je površina gela prekrivena puferom. Uređaj za elektroforezu je zatim spojen s izvorom napajanja, tako da je strana gdje se nalaze uzorci spojena na katodu, jer je DNA negativno nabijena pa će pod utjecajem elektromagnetskog polja kretati prema pozitivno nabijenoj anodi. Uvjeti elektroforeze su bili isti za sve koncentracije gela kako slijedi napon 70 volti i struja 40mA u trajanju od 1 sat i 30 minuta (slika 8).



Slika 8. Pokretanje uređaja za elektroforezu

(autor: M.K. Mak)



Slika 9. Razdvajanje boja i uzoraka DNA

(autor: M.K. Mak)

Nakon procesa elektroforeze, gel je stavljen u digitalni uređaj za snimanje gelova G:BOX F3 (slika 10). Uređaj ima ugrađenu kameru rezolucije 3,8 megapiksela. Uređaj je dizajniran za uobičajene analize koje koriste fluorescenciju kao što su analize DNA i/ili proteina. Moguće je slikati gelove birajući bijelo svjetlo za gelove bojane bojom Comassie blue ili pod UV svjetlom za uzorke obojane etidij bromidom, SYBR Safe, Olerup GelRed bojama. Nakon slikanja svih gelova koncentracije od 0,8 do 3% pristupilo se analizi slika (GeneSys) uzoraka DNA pomoću GeneTools programa.

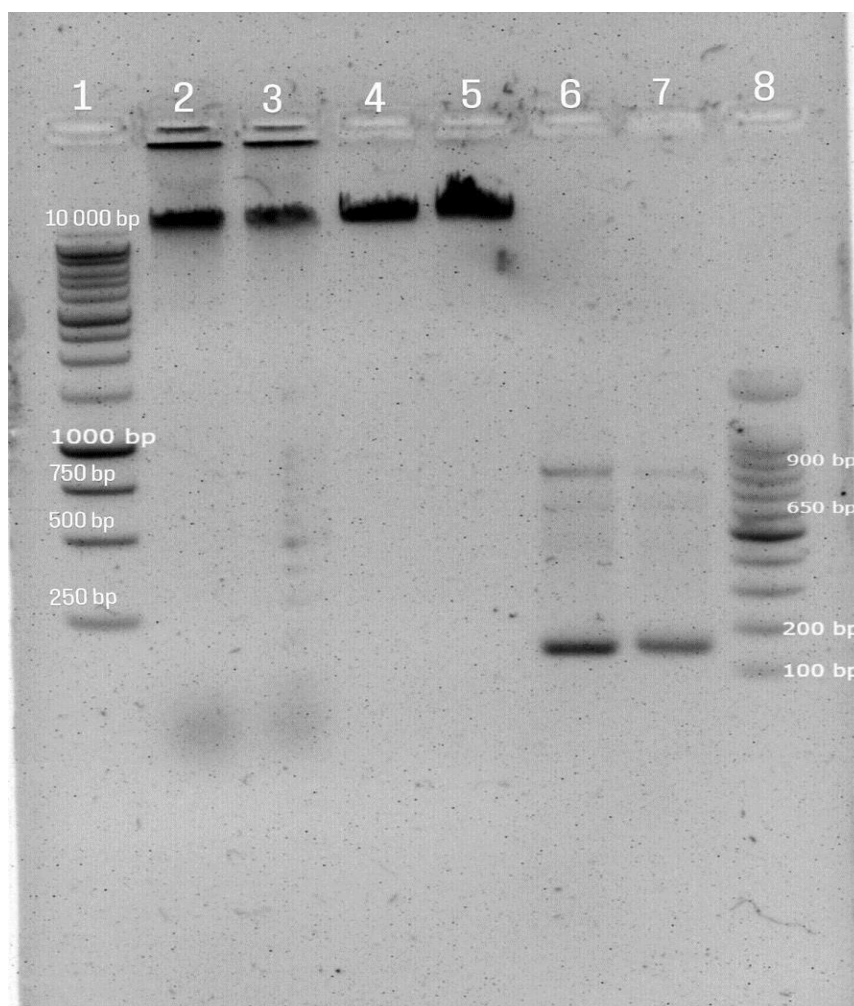


Slika 10. Priprema za snimanje gela pod UV svjetlom

(autor: M.K. Mak)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Na 0,8%-tnom agaroznom gelu (slika 12), jasno je vidljivo razdvajanje uzoraka te potvrda da su se uzorci genomske DNA veći tj. sastoje se od više parova baza nego PCR uzorci (broj 6 i 7). Uz pomoć DNA standarda (ljestve) raspona od 100 do 10 000 pb vidljivo je nepotpuno razdvajanje ljestvi, no ipak se može vidjeti da su uzorci broj 2 (genomska DNA pšenice) i 3 (genomska DNA graha) te uzorci 4 (lambda DNA 100) i 5 (lambda DNA 200) veličine preko 10 000 pb koncentracije nešto niže od lambda DNA 100. Navedeno je potrebno provjeriti ponovljenom analizom pri čemu treba genomsku DNA usporediti i sa standardom lambda DNA od 50 ng/mL. Nepostojanje razmaza u uzorcima DNA također ukazuje na to da je izolirana genomska DNA i pšenice i graha vrlo dobre kvalitete za čiju je čistoću i procjenu koncentracije je potrebno provesti spektrofotometrijsku analizu. Veličine fragmenata PCR pšenice i graha gotovo su identične i iznose od 150 do 156 pb.



Slika 11. Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu koncentracije 0,8%

(autor: M.K. Mak)

Uspješnu analizu genomske DNA na agaroznom gelu koristeći 0,8%-tnu koncentraciju agaroze navodi i Kurilj (2016.) u završnom radu „Metode izolacije DNA za ljekovito i aromatično bilje“. U prethodno navedenom završnom radu, agarozni gel 0,8% koncentracije korišten je zbog visoke razlučivosti iznimno dugačke, genomske DNA.

Na gelu od 1% koncentracije agaroze (slika 12), iako su uzorci teško razlučivi, vidljivo je da su uzorci PCR fragmenta najmanji, jer su najdalje migrirali.



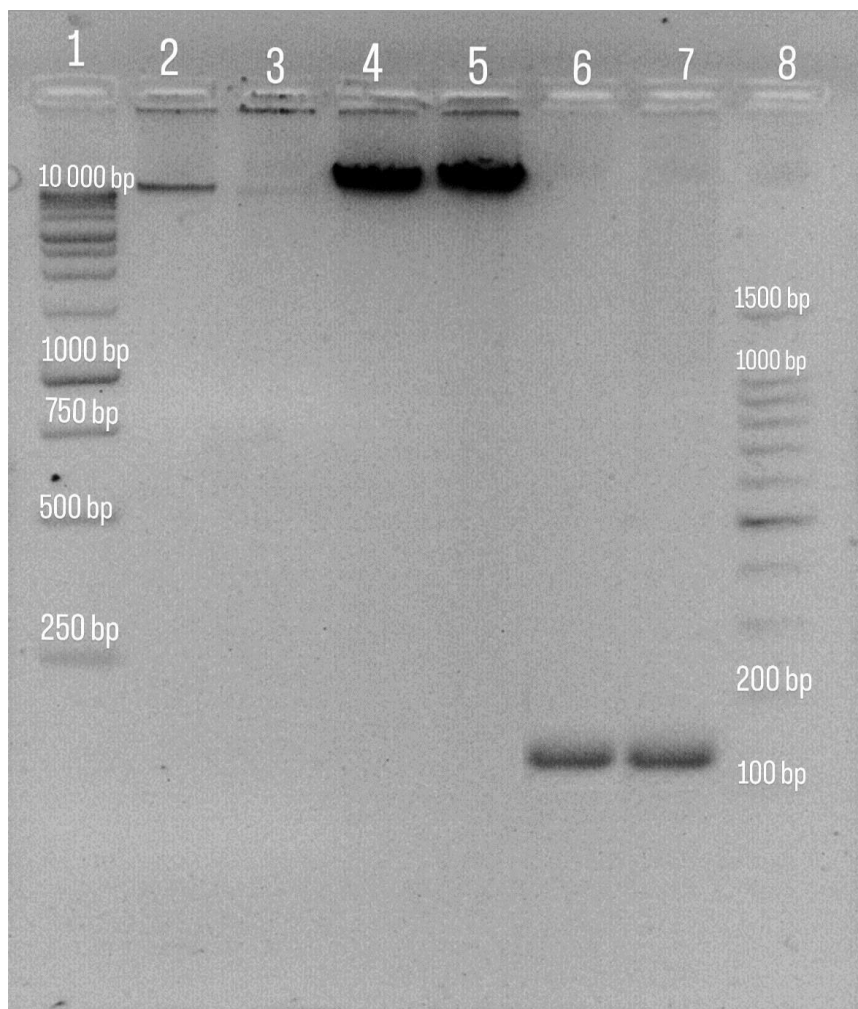
Slika 12. Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu koncentracije 1%

(autor: M.K. Mak)

Slabo razdvajanje uzoraka moguće je zbog veličine samih fragmenata, odnosno, preveliki fragmenti slabije su se razdvojili već u 0,8%-tnom agaroznom gelu. Nanošenje uzoraka u gel također ima jako veliku ulogu pri samoj analizi kao što je nedovoljno otopljena DNA

nakon metode izdvajanja, slabo promiješani uzorci. „Razmazivanje“ odnosno uočavanje difuznih elektroforetskih pruga je također je jedna od mogućih posljedica koje se mogu javiti zbog različitih uzroka kao što su: prevelika jakost električnog polja (prevelika voltaža), prevelika količina DNA u uzorku te prelijevanje uzoraka iz jažice (uzorci 4 i 5). Vrlo slab ili tzv. „nevidljivi“ uzorak (uzorci 1, 2, 3 i 8) posljedica je premale količine DNA u uzorku, nepažljivog nanošenja uzorka u gel ili nedovoljne količine Olerup boje koja je dodana u premaloj koncentraciji (Ambriović Ristov, 2007). O veličini očekivanih produkata ovisio je postotak gela te je tako za veće produkte pripremljen 1% gel, a za manje 2% agarozni gel (Guberac, 2020).

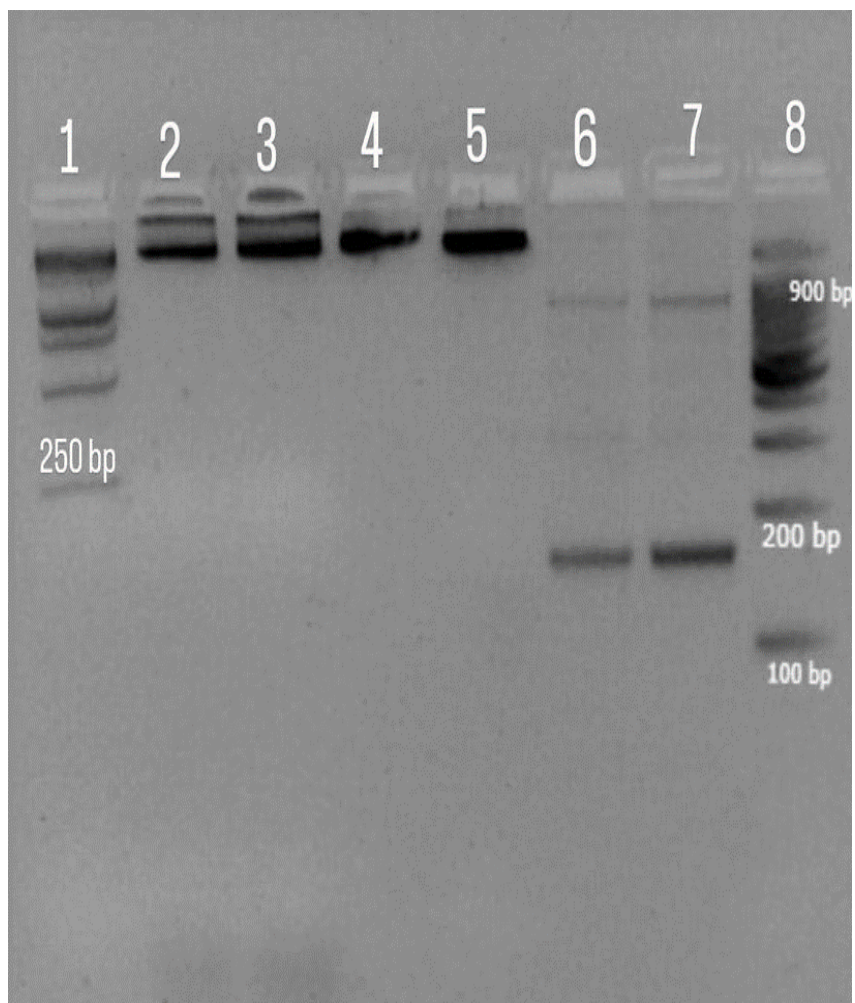
Na agaroznom gelu koncentracije od 2% (slika 13) vidljivo je slabije razdvajanje uzoraka od 1 do 5. S obzirom na to da se radi o uzorcima genomske DNA s većim brojem parova baza kao što je navedeno na prethodnim slikama 11 i 12 moguće ih je bolje analizirati na gelu niže koncentracije. PCR uzorke pšenice i graha (uzorci 6 i 7) bilo je moguće analizirati i utvrditi da su veličine od 100 i 200 pb, što se može usporediti s uzorkom DNA ljestvi (uzorak 8). Odabir odgovarajuće koncentracije agaroznog gela pri analizi rezultata nakon PCR reakcije uvelike ovise o odabiru samih početnica te očekivanoj duljini umnoženog dijela DNA. Tako se fragmenti mogu kretati od 110 pb u analizi prisutnosti translokacije raži u pšenici koristeći RIS početnice (Guberac, 2014) do 1060 pb u analizi prisutnosti gena za vernalizaciju u pšenice (Puškarić, 2015).



Slika 13. Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu koncentracije 2%

(autor: M.K. Mak)

Zbog velike duljine fragmenata uzoraka genomske i λ DNA (uzorci 2, 3, 4, 5) u najgušćem, 3%-tnom gelu, određena količina uzoraka nije niti izašla iz jažica gela. Kao što je vidljivo na slici 14, veličina tih fragmenata je oko 10 000 pb. PCR uzorci pšenice i graha (uzorci 6 i 7) najjasnije se vide te ih je moguće analizirati i odrediti veličinu. Usporedbom uzorka DNA ljestvi (uzorak 8) i uzorka PCR fragmenata (uzorci 6 i 7) dobivena je veličina od 100 do 200 pb, točnije oko 175 pb. Prema Steward (2022) gelovi s većim postotkom agaroze dat će bolju rezoluciju malih fragmenata.



Slika 14. Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu koncentracije 3%

(autor: M.K. Mak)

4. ZAKLJUČAK

Na temelju laboratorijskih istraživanja tijekom 2023. godine provedenih u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, analizom DNA fragmenata metodom agarozne gel elektroforeze, može se zaključiti sljedeće:

1. Veliki DNA fragmenti sporije se kreću gelom te prelaze manji put, pod utjecajem električnog polja, dok se manji DNA fragmenti kreću brže i prelaze veći put.
2. Za točniju analizu i određivanje veličina fragmenata većih, koncentriranijih uzoraka, npr. genomske DNA, koriste se gelovi manje koncentracije, 1% i manje.
3. Za točniju analizu i određivanje fragmenata manjih uzoraka, PCR fragmenata, koriste se gelovi koncentracija od 2 do 3%, a najučestaliji je agarozni gel od 2%.
4. Veličina genomske DNA iznosi preko 10 000 pb, dok su veličine PCR fragmenata pšenice i graha bile oko 150 pb.
5. Čak i u idealnim laboratorijskim uvjetima postoji mogućnost grešaka te je od iznimne važnosti uvidjeti razlog pogreške te ju popraviti.

5. POPIS LITERATURE

1. Ambriović Ristov, A. (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Poglavlje 2. Izdvajanje i analiza DNA. Zagreb
2. Cooper, G.M. i Hausman, R. E. (2010): Stanica: Molekularni pristup. Peto izdanje. Zagreb.
3. Doyle, J. (1991): DNA Protocols for Plants. Molecular Techniques in Taxonomy. pp. 283-293.
4. Guberac, S. (2020): Asocijativna analiza fenotipskih svojstava heksaploidne pšenice i molekularnih markera. Doktorska disertacija. Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
5. Guberac, S. (2014): 1B/1R translokacija u hrvatskom sortimentu ozime pšenice. Diplomski rad. Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
6. Hasith Priyashantha, A.K. i Umashankar, S. (2021): Separation of DNA Fragments using Agarose Gel Electrophoresis; Protocol, Results, Principle and Possible Errors to Avoid. U: Kumar, S. (ur.) Advances in Biotechnology and Bioscience. str. 45-50.
7. Kasibhatla, S., Amarante- Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzler, E., Green, D.R. (2006): Analysis of DNA fragmentation using agarose gel electrophoresis.
8. Kurilj, M. (2016.): Metode izolacije DNA za ljekovito i aromatično bilje. Završni rad. Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
9. Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu C.Y., Kim Y.H. (2012): Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Journal of Visualized Experiments, (62) e3923, 1-5.
10. Loenen, W.A., Dryden, D.T., Raleigh, E.A., Wilson, G.G., Murray, N.E. (2014): Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. Nucleic Acids Res. Jan;42(1):3-19.
11. Piljac, I. (2006): Elektroforeza. Zagreb.
12. Puškarić, J. (2015): Identifikacija Vrn gena u hrvatskom sortimentu ozime pšenice. Diplomski rad. Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
13. Stewart, K. (2022): Agarose Gel Electrophoresis, How it Works and Its Uses

Internetske stranice:

1. Britannica (2023) Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/DNA> [18. kolovoza 2023.]
2. Qiagen, Dostupno na: <https://www.qiagen.com/> [18. kolovoza 2023.]
3. Microbiology note, Dostupno na: [Agarozni gel elektroforeza Definicija, princip, postupak, primjena \(microbiologynote.com\)](https://microbiologynote.com) [9. rujan 2023.]
4. National Human Genome Research Institute (2023), Dostupno na: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction> [9. rujan 2023.]