

ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΤΑΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ

**Ζαχαρίου Αγγελική¹, Πανδής Σπυρίδων¹, Βελεγράκη Αριστέα² και
Καμπούρης Μανούσος Εμμ.¹**

¹Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας-Πρόνοιας, ΑΤΕΙ Αθηνών, Αγ.
Σπυρίδωνος, Αιγάλεω 12210.

² Ειδικό Εργαστήριο Μυκητολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, Μικράς Ασίας 75-77 Γουδή, 11527

Περίληψη

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η Διακριτική Ικανότητα και λοιπές λειτουργικές παράμετροι πηκτωμάτων αгарόζης τυπικών ηλεκτροφορητικών εφαρμογών διαφόρων συγκεντρώσεων με βάση εργαστηριακά ευρήματα και αποτελέσματα και να γίνει μια τεκμηριωμένη κατηγοριοποίηση αυτών ανάλογα με την ικανότητά τους να διαχωρίζουν θραύσματα DNA διαφόρων μεγεθών με αναλυτική επάρκεια.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αгарόζης σε TBE συγκέντρωσης 0,5%, 0,8%, 1,2%, 1,6%, 2%, 2,5%, 3% και 3,5% και σε αυτά ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα DNA από PCR μυκητολογικών εφαρμογών τυχαίας διαλογής και πρότυπος ενδείκτης μοριακών μεγεθών κλιμακούμενου βήματος 100 ζευγών βάσεων. Η κάθε ηλεκτροφόρηση ήταν κανονικοποιημένη με βάση την άφιξη της ταχείας χρωστικής του διαλύματος φόρτωσης στο άκρο του πηκτώματος.

Τα πηκτώματα φωτογραφήθηκαν και, χρησιμοποιώντας τυπικά λογισμικά εργαλεία ευρείας χρήσης σε ηλεκτρονικούς υπολογιστές (Microsoft Excel, Microsoft Word) καταρτίστηκαν πρότυπες καμπύλες κινητικότητας-μεγέθους ζωνών ανά πηκτώμα και προέκυψαν διαγράμματα μεταβολής ηλεκτροφορητικών ιδιοτήτων σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση. Ειδικότερα εξετάστηκε το κατά πόσο υπήρξε ισοταχής μετανάστευση κάποιων ζωνών του ενδείκτη με κάποια από τις χρωστικές του διαλύματος φόρτωσης καθώς και η Διακριτική Ικανότητα και το Εύρος Ένδειξης κάθε πηκτώματος, αλλά και άλλων συναρτημένων μεγεθών και παραμέτρων που ορίστηκαν.

Βάσει των συμπερασμάτων προτείνεται η χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης πηκτωμάτων ανάλογα με την εφαρμογή και το αναμενόμενο, προβλεπόμενο ή γνωστό μέγεθος τμημάτων που θα ηλεκτροφορηθούν.

Λέξεις –Κλειδιά

Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης, διακριτική ισχύς, πρότυπη καμπύλη, κινητικότητα ζωνών DNA

Εισαγωγή

Η χρήση πηκτωμάτων αгарόζης για ηλεκτροφόρηση στατικού πεδίου τμημάτων DNA θα παραμείνει η πλέον διαδεδομένη μέθοδος ανάγνωσης αποτελεσμάτων τεχνικών Μοριακής Βιολογίας σε πληθώρα διαγνωστικών, βιοτεχνολογικών και ερευνητικών εφαρμογών λόγω του χαμηλού κόστους, της παρασκευαστικής απλότητας, των ελαχίστων επενδύσεων και της διάσπαρτης ερευνητικής και τεχνικής τεχνογνωσίας στην χρήση τους (4, 7, 12, 23). Παρά την έλευση άλλων, ικανότερων και προηγμένων μεθόδων, όπως οι μικροσυστοιχίες (2) και η σύγχρονη ανάγνωση με χρωμοανίχνευση, αυτές απαιτούν ειδικές συσκευές και λογισμικό και έχουν σημαντικό κόστος (21), ενώ στερούνται επαρκούς ευκαμψίας για τροποποίηση των χρησιμοποιούμενων μεθόδων (3).

Η χρήση πηκτωμάτων αгарόζης για ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων DNA υπερτερεί σε συχνότητα και εύρος εφαρμογής, αλλά πολλάκις η χρήση είναι εμπειρική (18). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένη αποτελεσματικότητα και υποβέλτιστη συμπεριφορά που επιφέρουν σπατάλη χρόνου και πόρων για έκδοση δεδομένων αποτελεσμάτων προς κλινική, εμπειρική ή επιστημονική αξιοποίηση (5, 15, 17). Η πιθανότητα χρήσης διαφορετικής πυκνότητας πηκτώματος για διαφορετικές εφαρμογές, ανάλογα με το μέγεθος των αναμενόμενων θραυσμάτων είχε εξεταστεί προ πολλών ετών (10, 17, 18) αλλά ήταν

κυρίως εμπειρική, σε αντίθεση με τις περισσότερο εξατομικευμένες εφαρμογές μαρτύρων μοριακών μεγεθών. Το δεύτερο σήμαινε επιπλέον έξοδα για μάρτυρες με διαφορετικά βέλτιστα σύγκρισης και ανάλυσης (19). Η κανονικοποιημένη χρήση των μαρτύρων μοριακών μεγεθών σε συνδυασμό αφενός με απλές υπολογιστικές διαδικασίες που εκτελούνται από προσωπικούς υπολογιστές ή και με το χέρι και αφετέρου με την χρήση του κατάλληλου ηλεκτροφόρου για την εκάστοτε εφαρμογή μπορεί να αποφέρει μεγαλύτερο πληροφοριακό περιεχόμενο στα αποτελέσματα δεδομένων μοριακών διαδικασιών, να περιορίσει τον αριθμό επαναληπτικών πειραμάτων με αποτέλεσμα εξοικονόμηση χρόνου και πόρων και να επιτρέψει την υιοθέτηση της μεθοδολογίας σε εφαρμογές που την θεωρούσαν ανεπαρκώς ακριβή και προτιμούσαν άλλες, οικονομικώς επαχθέστερες και πειραματικώς δύσχρηστες προσεγγίσεις (16). Με τον τρόπο αυτό, η μεθοδολογία της απλής ηλεκτροφόρησης μπορεί να διαδοθεί ακόμη περισσότερο μειώνοντας την απαιτούμενη τεχνική υποδομή για συγκεκριμένους τύπους πειραμάτων και επανξάνοντας έτσι την συνολική ερευνητική και εμπορική δραστηριότητα (13).

Υλικά Και Μέθοδοι

Πραγματοποιήθηκαν συμβατικές ηλεκτροφορήσεις στατικού πεδίου με TBE 0.5X (2,25 mM Tris Base, 2,25 mM βορικό οξύ και 0.0625 mM EDTA) σε ηλεκτρόδια κλιμακούμενης συγκέντρωσης αгарόζης (0.5, 0.8, 1.2, 1.6, 2, 2.5, 3, 3.5 % κ.β.) και ωφέλιμου μήκους 7,37 cm (ολικό μήκος 8,14 cm) με βασικό φορτίο ενδείκτη μοριακών μεγεθών κλιμακούμενου βήματος 100 ζευγών βάσεων (14, 22). Το πήκτωμα ήταν κεχρωσμένο με φθορίζουσα χρωστική υπεριώδους-ορατού (βρωμιούχο αιθίδιο 4 μg/100ml) και χρησιμοποιήθηκαν και οπτικές χρωστικές για παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης (κυανού της βρωμοφαινόλης και κυανού του ξυλενίου, και τα δύο συστατικά του διαλύματος φόρτωσης) (8). Η ηλεκτροφόρηση έγινε υπό σταθερή ένταση ώστε να μειωθεί η επίπτωση στις κινητικές ιδιότητες των μορίων από την θερμική υποβάθμιση του ηλεκτροφόρου, και με κανονικοποιημένο χρόνο. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση την πρόοδο της ταχείας οπτικής χρωστικής (Κυανού της Βρωμοφαινόλης) του διαλύματος φόρτωσης και η ηλεκτροφόρηση σταματούσε όταν αυτή έφτανε εντός 2 cm από το πέρας του ηλεκτροφόρου (11). Στα ηλεκτρόδια 2%-3.5% απαιτήθηκαν επαναληπτικές ηλεκτροφορήσεις με ίδιες συνθήκες λόγω αδυναμίας ακριβών μετρήσεων λόγω ελλειμματικής ευκρίνειας. Οι γραφικές παραστάσεις έγιναν με τα δεδομένα των επαναληπτικών ηλεκτροφορήσεων.

Εκτός του μάρτυρα ηλεκτροφορήθηκαν προϊόντα PCR μκητιακών εφαρμογών σε τυχαία βάση, εξομοιώνοντας τις συνθήκες ηλεκτροφορητικές πρακτικές σε εργαστήρια. Τα ηλεκτρόδια (Εικόνα 1) φωτογραφήθηκαν υπό υπεριώδη καταύγαση και οι αποστάσεις που διένυσαν οι ζώνες DNA μετρήθηκαν (20). Η επεξεργασία έγινε με βάση την γραμμική σχέση μεγέθους (σε ζ.β.) εκάστου τμήματος DNA και του δεκαδικού λογάριθμου της διανυσθείσας από αυτό απόστασης επί του ηλεκτροφόρου σε δεδομένη χρονική στιγμή. Οι καμπύλες χαράχθηκαν αυτόματα από το τυπικό λογισμικό Microsoft XL με την αρχή της μέσης καμπύλης. Σε κάθε πήκτωμα προσδιορίστηκε σειρά ηλεκτροκινητικών και ηλεκτροδυναμικών ιδιοτήτων. Οι βασικές παράμετροι που ορίστηκαν και ονοματοδοτήθηκαν είναι οι ακόλουθες: Διακριτική Ικανότητα (ΔΙ), Εύρος Ένδειξης (ΕΕ), Αναλογική Διακριτική Ικανότητα (ΑΔΙ), Συγκριτική Ικανότητα Διαχωρισμού (ΣΙΔ) και Ειδική Διακριτική Ικανότητα (ΕΔΙ). Η ΔΙ εκφράζεται σε cm και ορίζεται ως η μέγιστη απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών ζωνών του ενδείκτη ανά πήκτωμα και εκφράζει αφενός το φάσμα μεγεθών στο οποίο μπορεί να παρατηρηθεί ο ακριβέστερος διαχωρισμός στο εκάστοτε πήκτωμα, και αφετέρου το εύρος αυτού του διαχωρισμού. Είναι μέγεθος που χρησιμεύει όταν τα θραύσματα έχουν γνωστό ή σχεδόν γνωστό μέγεθος και απαιτείται ακριβής, κατά το μάλλον ή ήττον διάκρισή τους. Το ΕΕ εκφράζεται σε cm, ορίζεται ως η διαφορά της απόστασης της μικρότερης από αυτήν της μεγαλύτερης ζώνης του ενδείκτη και δείχνει την καταλληλότητα ενός ηλεκτροφόρου για διαχωρισμό τμημάτων DNA μεγάλης ποικιλίας μεγεθών. Εξαρτάται, εκτός από το πήκτωμα, και από τον ενδείκτη. Η ΑΔΙ ορίζεται ως το ηλικό ΔΙ προς ΕΕ (καθαρός αριθμός) και εκφράζει την καταλληλότητα του ηλεκτροφόρου για ανάλυση τμημάτων DNA εκτός του βέλτιστου μεγέθους όπως αυτό εκφράζεται από την ΔΙ. Μικρή ΑΔΙ σημαίνει πολυχρηστικό πήκτωμα, μεγάλη ΑΔΙ εξειδικευμένο. Η ΕΔΙ εκφράζεται σε cm/ζ.β. και ορίζεται ως το ηλικό της ΔΙ προς το μήκος της μεγαλύτερης ζώνης του ενδείκτη ένθεν της οποίας παρατηρείται. Η χρησιμότητα της εντοπίζεται στο ότι λαμβάνει υπόψη το μέγεθος των τμημάτων που την ορίζουν, και το οποίο έχει μεγάλη σημασία τόσο για τη διάκριση παραπλήσιων μεγεθών όσο και για την ακρίβεια της εκτίμησης των μεγεθών. Όσο μεγαλύτερα είναι αυτά τα μεγέθη, δηλαδή όσο ελαττώνεται η τιμή της ΕΔΙ, μειώνεται η επίπτωση συγκεκριμένης διαφοράς μεγεθών στην ηλεκτροφορητική συμπεριφορά, και συνεπώς η δυνατότητα του παρατηρητή να διακρίνει διαφορετικά μεγέθη ζωνών, όπως και να εκτιμήσει τα μεγέθη τους συγκριτικά με τις ζώνες του ενδείκτη. Σε αντίθεση με όλα τα ανωτέρω μεγέθη που χαρακτηρίζουν το πήκτωμα, η ΣΙΔ ορίζεται ως η μέγιστη απόσταση μεταξύ

συγκεκριμένων διαδοχικών ζωνών του ενδείκτη ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης του πηκτώματος, εκφράζεται σε cm και επιτρέπει την επιλογή της συγκέντρωσης του πηκτώματος ανάλογα με τα αναμενόμενα μεγέθη των τμημάτων DNA που θα ηλεκτροφορηθούν.

Η ηλεκτροφόρηση και προϊόντων PCR, των οποίων το μέγεθος ήταν γνωστό από προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger (sequencing-αλληλουχοποίηση) επέτρεψε την σύγκριση των γνωστών μεγεθών (βλ Πίνακα 1) με αυτά που προέκυπταν από την μέτρηση της απόστασης που διένυσαν επί του πηκτώματος και εξαγωγή του μεγέθους από την πρότυπη καμπύλη (η διαδικασία γινόταν αυτόματα από το λογισμικό). Η διαφορά των δύο μεθόδων χαρακτηρίστηκε ως απόκλιση και διαιρούμενη με το πραγματικό μέγεθος και αναγόμενη επί % έδινε την εκατοστιαία απόκλιση. Η εκατοστιαία απόκλιση προσδιορίστηκε και σε περιπτώσεις όπου ηλεκτροφορήθηκαν άνω του ενός προϊόντα, για κάθε ένα από αυτά. Στις περιπτώσεις αυτές υπολογίστηκε η ακρίβεια του πηκτώματος. Πρόκειται για μέγεθος χαρακτηριστικό του πηκτώματος που ορίστηκε ως $A = \{(100 - \text{μέση εκατοστιαία απόκλιση}) \%$ και καταδεικνύει την γενική καταλληλότητα του πηκτώματος για ηλεκτροφορήσεις θραυσμάτων DNA διαφορετικών μεγεθών μετά από πειράματα προτυποποίησης και βελτιστοποίησης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Τύποι προϊόντων PCR με ειδικούς εναρκτές και αληθή μεγέθη αυτών

Προϊόν (εναρκτές)	Μέγεθος (ζ.β.)
- <i>C. parapsilosis</i> (pCon1/2)	480
- <i>A. fumigatus</i> (SSU 1/7)	550
- <i>Aspergillus</i> sp. (SSU 1/7)	480
- <i>C. glabrata</i> . (ITS 1/4)	550
- <i>C. neoformans</i> URA (1/2)	345

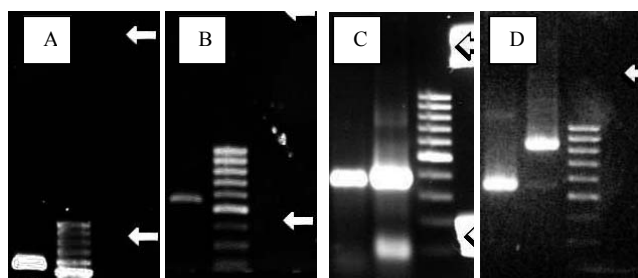
Αποτελέσματα

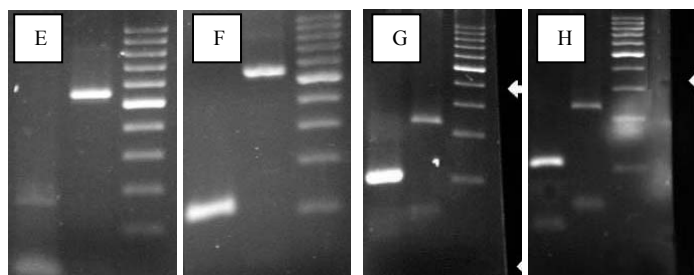
Προτυποποίηση ταχύτητας χρωστικών

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, πλην εξαιρέσεων (πηκτώματα 1.6% και 2%) έγινε εφικτή η προτυποποίηση τουλάχιστον μίας εκ των χρωματικών χρωστικών (Κυανούν της Βρωμοφαινόλης ή ταχεία χρωστική, Κυανούν του Ξυλενίου ή Βραδεία χρωστική) με ζώνες DNA συγκεκριμένου μεγέθους ανά πήκτωμα (Πίνακας 2), ώστε η οπτική εξέταση να δείχνει αντικειμενικά και όχι εμπειρικά την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης. Ούτως εξοικονομείται χρόνος και αποφεύγονται πειραματικές αποτυχίες από εκφυγή των ζωνών από το πήκτωμα ή από φωτουποβάθμισή τους από επανειλημμένη έκθεση στο υπεριώδες, προκειμένου να υπάρξει οπτική εικόνα και να εκτιμηθεί ακριβώς η πρόοδος της ηλεκτροφόρησης. Το μεγαλύτερο πρόβλημα ήταν η διάχυσή τους στο πήκτωμα, με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνδεσής τους με συγκεκριμένη ζώνη του ενδείκτη.

EIKONA 1

Ηλεκτροφορήσεις πηκτωμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων αгарόζης: A: 0,5%; B:0,8%; C:1,2%; D: 1,6%; E:2%; F: 2,5%; G:3%; H: 3,5%. Τα βέλη δείχνουν τα μέτωπα των χρωστικών





ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Προτυποποίηση κινητικότητας τμημάτων DNA και οπτικών χρωστικών ανά πήκτωμα

Πήκτωμα (% κ.β.)	Χρωστική	Ισοταχής ζώνη (ζ.β)
0,5	T ¹ (Κ.Β)	800-900
0,8	T (Κ.Β)	400
1,2	T (Κ.Β)	100-200
2,5	B ² (Κ.Ξ)	600
3	B (Κ.Ξ)	300-400
3,5	B (Κ.Ξ)	300

¹ Κυανούν της Βρωμοφαινόλης, ταχεία χρωστική (T)

² Κυανούν του Ξυλενίου, Βραδεία χρωστική (B)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Κινητικά αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων

% min	0,5%		0,8%				1,2%		1,6%	2%	2,5%	3%	3,5%	
	45	90	30	60	90	113	30	143	121	115	115	128	135	
100bp	3,74	&	&	4,23	6,39	-	3,8	5,65		5,07	4,23	3,7	3,36	
200bp				4,01	6,06	7,37	3,45	5,15	5,58	4,46	3,48	2,87	2,47	
300bp				3,74	5,71	7	3,12	4,68	5,08	3,94	2,95	2,34	1,93	
400bp				6,47	3,53	5,4	6,6	2,86	4,33	4,66	3,54	2,55	1,97	1,59
500bp				6,42	3,37	5,15	6,3	2,69	4,03	4,27	3,21	2,24	1,71	1,35
600bp				6,22	&	4,89	5,99	2,49	3,73	3,96	2,91	1,97	1,47	1,14
700bp				6,04		4,74	5,75	2,34	3,48	3,66	2,67	1,77	1,31	0,98
800bp				5,87		4,54	5,53	2,2	3,29	3,44	2,47	1,59	1,18	0,89
900bp				5,69		4,37	5,32	2,08	3,08	3,21	2,28	1,43	1,04	0,77
1000bp	2,79			5,53		1,48	2,69	4,21	5,13	1,96	2,91	3,03	2,1	1,28

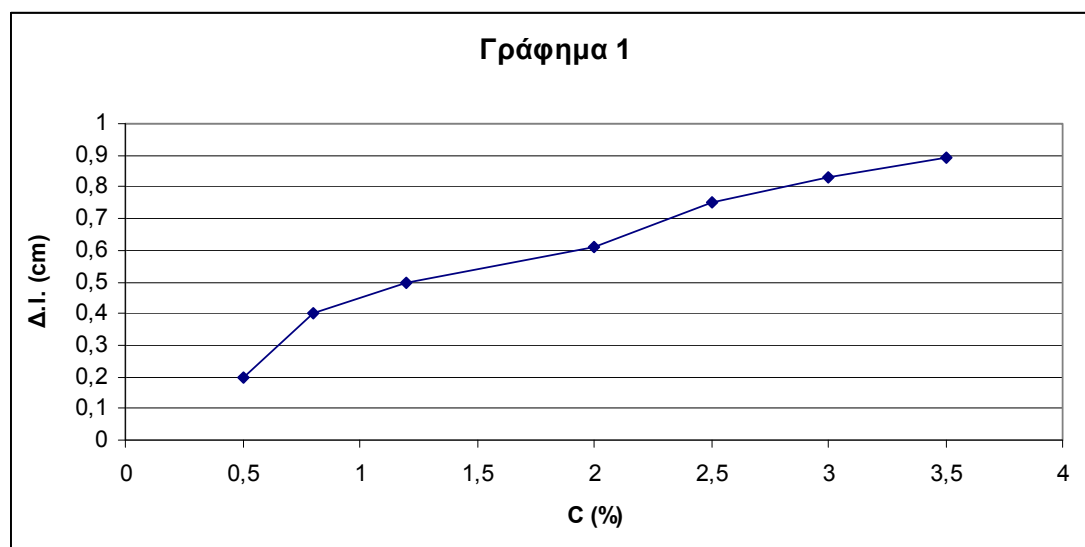
Παρατίθενται οι αποστάσεις που διένυσαν οι ζώνες του ενδείκτη σε εκατοστά (cm) σε συγκεκριμένο χρόνο (min) με βάση την συγκέντρωση του πήκτωματος αгарόζης. Ο χρόνος είναι κανονικοποιημένος με την απόσταση της ταχείας χρωστικής.

[- Οι ζώνες του ενδείκτη έφυγαν από το πήκτωμα στον χρόνο λήξης]

[& Οι ζώνες του ενδείκτη δεν έχουν διαχωριστεί]

Τα κατωτέρω διαγράμματα επιδεικνύουν την μεταβολή των διαφόρων ηλεκτροκινητικών και ηλεκτροδυναμικών παραγόντων συναρτήσει της συγκέντρωσης των πηκτωμάτων.

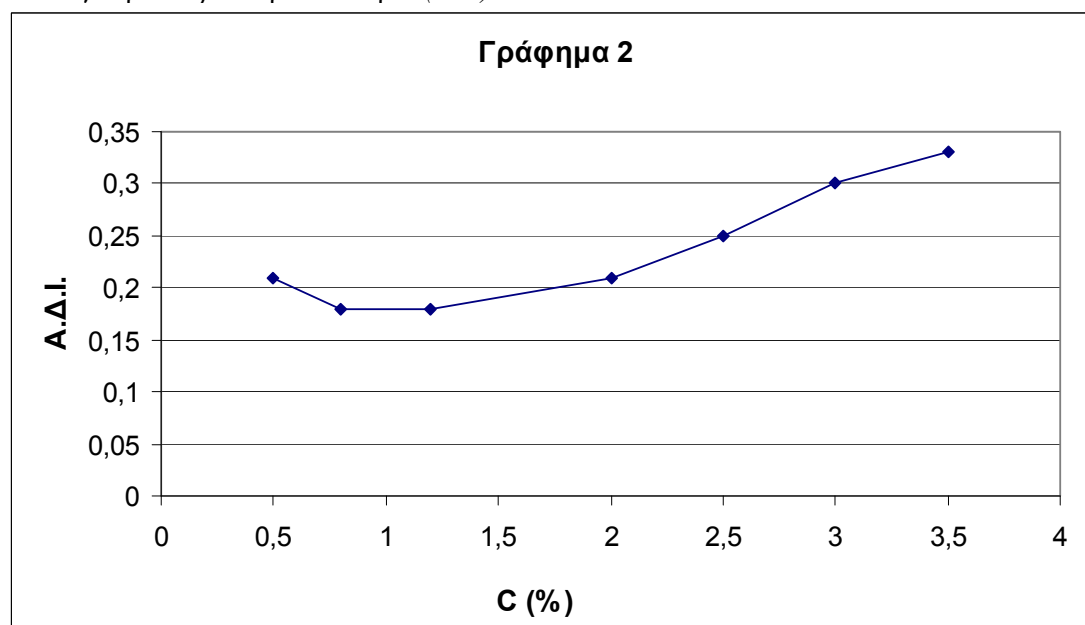
Διακριτική Ικανότητα (ΔΙ)



Γράφημα 1. Η Διακριτική Ικανότητα (Δ.Ι.) συναρτίζεται της συγκέντρωσης (C) του πηκτώματος αγαρόζης. Επίσης στον Πίνακα Τιμών 1 παραθέτουμε και το ζεύγος ζωνών ανάμεσα στις οποίες υπολογίστηκε η Δ.Ι.

Συγκέντρωση πηκτώματος (%)	0,5	0,8	1,2	1,6	2	2,5	3	3,5
Διακριτική ικανότητα	0,2	0,4	0,5	0,5	0,61	0,75	0,83	0,89
Ζεύγος ζωνών (bp)	600 – 500	400 – 300	200 – 100	300 – 200	200 – 100	200 – 100	200 – 100	200 – 100

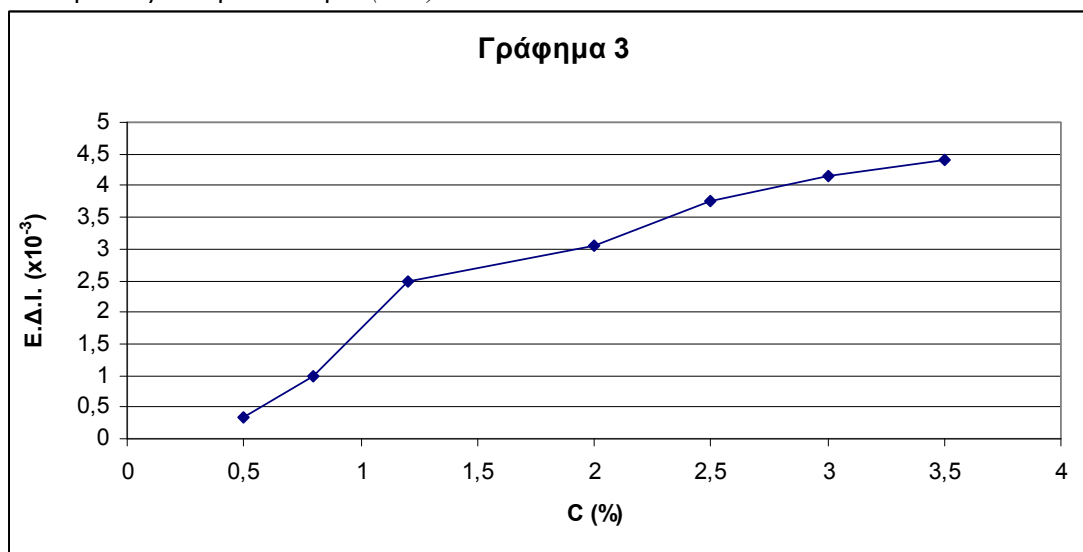
Αναλογική Διακριτική Ικανότητα (ΑΔΙ)



Συγκέντρωση πηκτώματος (%)	0,5	0,8	1,2	1,6	2	2,5	3	3,5
Διακριτική Ικανότητα (cm)	0,2	0,4	0,5	0,5	0,74	0,9	0,8	0,98
Εύρος Ένδειξης (cm)	0,94	2,24	2,74	2,55	2,97	2,95	2,75	2,69
Αναλογική διακριτική ικανότητα	0,21	0,18	0,18	0,2	0,21	0,25	0,30	0,33

Γράφημα 2. Η Αναλογική Διακριτική Ικανότητα **Α.Δ.Ι.** συναρτήσει της συγκέντρωσης (**C**) του πηκτώματος αγαρόζης

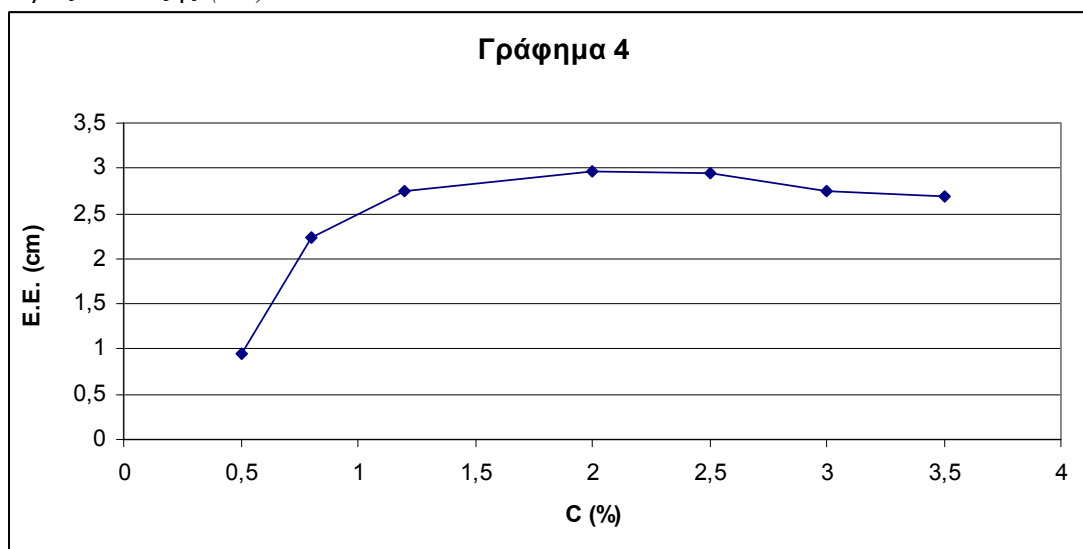
Ειδική Διακριτική ικανότητα (*EAI*)



Συγκέντρωση πηκτώματος (%)	0,5	0,8	1,2	1,6	2	2,5	3	3,5
Διακριτική Ικανότητα (cm)	0,2	0,4	0,5	0,5	0,74	0,9	0,8	0,98
Μεγαλύτερη Ζώνη	600	400	200	300	200	200	200	200
E.Δ.Ι. (x10 ⁻³)	0,33	0,1	2,5	1,66	3,05	3,75	4,15	4,45

Γράφημα 3. Η Ειδική Διακριτική Ικανότητα **E.Δ.Ι.** συναρτήσει της συγκέντρωσης (**C**) του πηκτώματος αγαρόζης. Λόγω του ότι οι τιμές που προκύπτουν είναι πολύ μικρές εκφράζονται επί 10⁻³.

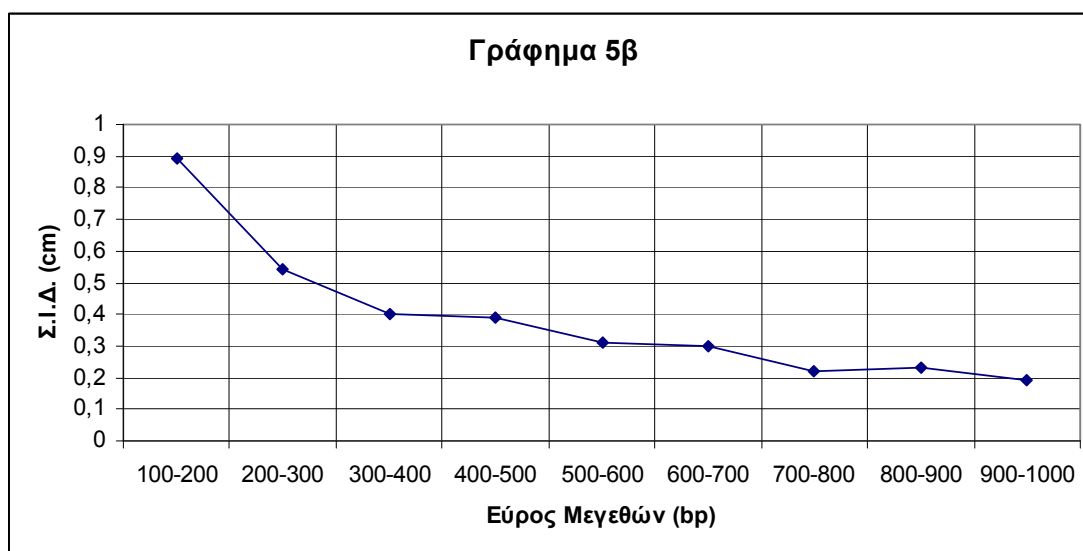
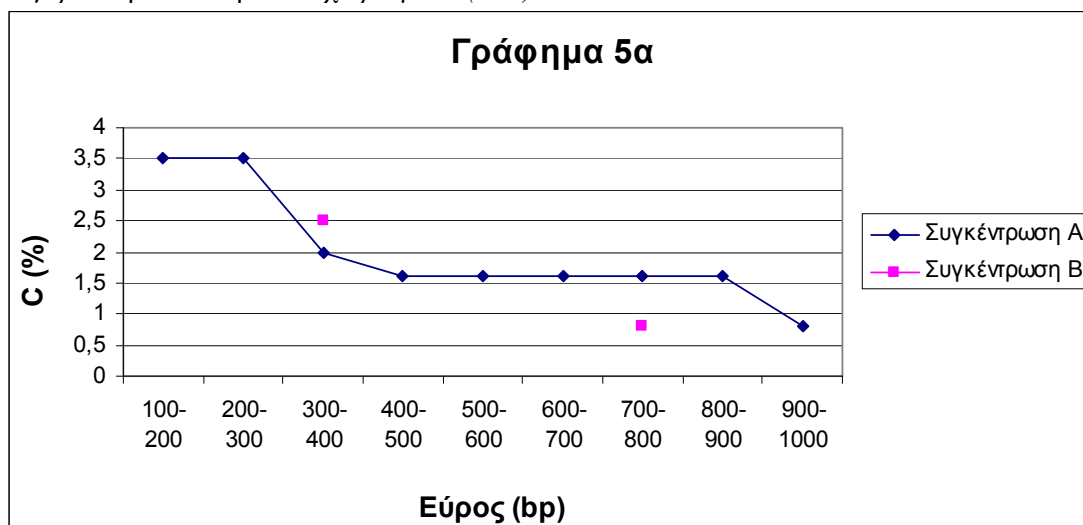
Εύρος Ένδειξης (*EE*)



Εύρος Ένδειξης (cm)	0,94	2,24	2,74	2,55	2,97	2,95	2,75	2,69
C (%)	0,5	0,8	1,2	1,6	2	2,5	3	3,5

Γράφημα 4: Το Εύρος Ένδειξης κάθε πηκτώματος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωσή του.

Συγκριτική Ικανότητα Διαχωρισμού (ΣΙΔ)



Πίνακας Τιμών 5

Εύρος Μεγεθών (bp)	100-200	200-300	300-400	400-500	500-600	600-700	700-800	800-900	900-1000
Καταλληλότερη Συγκέντρωση (%)	3,5	3,5	2 & 2,5	1,6	1,6	1,6	1,6 & 0,8	1,6	0,8
Σ.Ι.Δ. (cm)	0,89	0,54	0,4	0,39	0,31	0,3	0,22	0,23	0,19

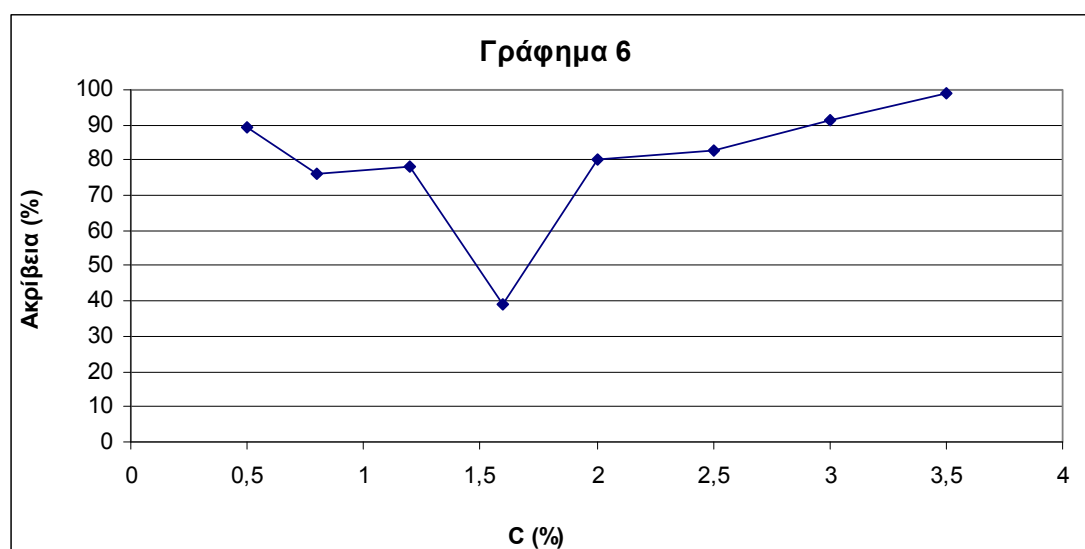
Γράφημα 5α & 5β: Η καταλληλότερη συγκέντρωση πηκτώματος βάσει της Σχετικής Ικανότητας Διαχωρισμού (ΣΙΔ), δηλαδή της μέγιστης απόστασης μεταξύ δύο συγκεκριμένων διαδοχικών ζωνών του ενδείκτη ανεξαρτήτως συγκέντρωσης πηκτώματος.

Ακρίβεια πηκτωμάτων

Η ακρίβεια των πηκτωμάτων φάνηκε να επηρεάζεται από την συγκέντρωσή τους, όπως φαίνεται στα κατωτέρω διαγράμματα, αλλά τα αποτελέσματα αυτά όπως προαναφέρθηκε δεν είναι κανονικοποιημένα, διορθωμένα ή σταθμισμένα. Πρόκειται για δεδομένα που προκύπτουν από την σύγκριση των τιμών μεγέθους που εξάγονται από την βασική πρότυπη καμπύλη με τις αντίστοιχες τιμές της αλληλοχρησιμοποίησης.

Πίνακας Τιμών 6

C (%)	0,5	0,8	1,2	1,6	2	2,5	3	3,5
Ακρίβεια (%)	89,58	76,25	78,15	39,12	80,42	82,81	91,5	98,85



Γράφημα 6: Η μεταβολή στην Ακρίβεια κάθε πηκτώματος.

Συμπεράσματα- Συζήτηση

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, οι τιμές για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων δεν ήταν διαθέσιμες σε όλα τα πηκτώματα. Στο πήκτωμα συγκέντρωσης 0,5% όταν οι ταχείες ζώνες του εναρκτή ήταν εντός πεδίου, οι βραδείες δεν είχαν διαχωριστεί, κι όταν οι βραδύτερες διαχωρίστηκαν οι ταχείες είχαν εκπλυθεί στο διάλυμα. Συνεπώς, και με βάση ότι τέτοια πηκτώματα χρησιμοποιούνται για μέσες και βραδείες ζώνες (μέχρι 150 ζ.β. χρησιμοποιείται συνήθως ακρυλαμίδιο ή αραρόζες υψηλής διακριτικότητας -11, 18) επελέγη ως χρηστικό το στιγμιότυπο με υψηλό διαχωρισμό των ζωνών κι οι υπολογισμοί έγιναν τότε. Επιπλέον, παράγων για την επιλογή αυτή ήταν η πρόθεσή μας να τηρηθεί μια κανονικότητα, και ως βάση επελέγη η κίνηση της ταχείας χρωστικής έως το άκρο του πηκτώματος (~1 cm). Στο πήκτωμα συγκέντρωσης 0,8% τηρήθηκε ο ίδιος κανόνας με αποτέλεσμα να υπολογιστούν τα αντίστοιχα μεγέθη στα 113' ηλεκτροφόρησης, παρά την απώλεια της ζώνης των 100 ζ.β. Στην περίπτωση όμως αυτή έχουμε τη βεβαιότητα ορθού υπολογισμού ΔΙ επειδή η μεγαλύτερη διαφορά αποστάσεων παρατηρείται μεταξύ 400 και 300 ζ.β., ενώ τόσο μεταξύ 200-300 όσο και μεταξύ 500-400 οι τιμές είναι κατώτερες. Αυτό προφανώς υπαινίσσεται μεγιστοποίηση των τιμών μεταξύ 300 και 400 ζ.β., συνεπώς, η ΔΙ υπολογίζεται μεταξύ αυτών των ζωνών, ακόμη κι όταν έχει εκφύγει η ζώνη 100 ζ.β. στα 113'.

Αντίθετα, στο πήκτωμα 1,6% δεν είναι δεδομένη η εκφυγή της πρώτης ζώνης: η φωτεινότητα των αμέσως επομένων υποδηλώνει πιθανή ανεπάρκεια σήματος. Επομένως, δεν μπορεί να δοθεί τιμή Διακριτικής Ικανότητας (ΔΙ) ως κάτω όριο. Το ίδιο ισχύει και για το ΕΕ και συνεπώς για τα εξαγόμενα μεγέθη, ούτε να ακολουθηθεί η πρακτική που ακολουθήθηκε στα πηκτώματα 0,5% και 0,8%. Ως εκ τούτου, το πήκτωμα εξαιρέθηκε από την χάραξη των συγκεκριμένων μεγεθών, αλλά διατηρήθηκε για την εκτίμηση των ΣΙΔ στις διάφορες περιοχές μεγεθών. Είναι ιδιαίτερα αξιοπρόσεκτο ότι στο πήκτωμα αυτής της συγκέντρωσης πιστώνονται 5 από τις συνολικά 9 τιμές ΣΙΔ, όλες στις μεσαίες και μεγάλες περιοχές μεγεθών, κάτι που ερμηνεύει την εμμονή πολλών εργαστηριακών του παρελθόντος στην χρήση του σε διάφορα πρωτόκολλα ανεξαρτήτως αναμενόμενου μεγέθους προϊόντος. Όπως είναι αναμενόμενο, η ΣΙΔ στις περιοχές μικρών μεγεθών πιστώνεται στα πηκτώματα 3,5% που όμως είναι αρκετά δύσχρηστα για χρήση ρουτίνας από μη εξειδικευμένα εργαστήρια. Αντίθετα τα πολύ περισσότερο εύχρηστα πηκτώματα των 2 και 2,5% πιστώνονται το ΣΙΔ στην πλέον συνηθισμένη περιοχή μεγεθών, μεταξύ 300 και 400 ζ.β., κάτι που ερμηνεύει την συστηματική τους προτίμηση σε μεγάλο αριθμό εργασιών όπου μελετώνται τέτοια τμήματα. Στις περιοχές των μεγίστων μεγεθών το πήκτωμα 0,5%, τουλάχιστον στην κανονικοποιημένη ηλεκτροφόρηση που θεωρούμε εφικτή για μη ειδικούς και μαζικούς χρήστες, δεν δείχνει ιδιαίτερες αρετές, σε αντίθεση με το 0,8%, το οποίο πιστώνεται το ΣΙΔ της περιοχής μέγιστων μεγεθών (1000-900 ζ.β.) και είναι πολύ κοντά, ή συμπίπτει το ΣΙΔ των περιοχών των αμέσως κατωτέρων μεγεθών (900-800 και 800-700 ζ.β.).

Με το πήκτωμα 1,6% εκτός εικόνας ως προς τα βασικά ηλεκτροφορητικά μεγέθη, γίνεται εμφανής η

σημασία του αντιστοίχου συγκέντρωσης 1,2%. Παρουσιάζει το μέγιστο ΕΕ και την ελάχιστη ΑΔΙ, με αποτέλεσμα ορθώς να θεωρείται πολυχρηστικό και να προτείνεται από πολλά πρωτόκολλα (20) ως λύση γενικής χρήσης.

Βασική παρατήρηση είναι το ότι μόλις η συγκέντρωση αгарόζης ξεπεράσει το 1% η ΔΙ φαίνεται να εμφανίζεται σταθερά μεταξύ 100 κι 200 ζ.β., κάτι απογοητευτικό, αφού στην κλίμακα αυτή γενικώς προτιμάται το πολυακρυλαμίδιο. Από την άλλη μεριά, αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν εναλλακτικές στη χρήση του ακρυλαμιδίου, με πυκνά πηκτώματα αгарόζης. Αντίθετα, όταν τα μεγέθη των τμημάτων DNA αυξάνονται, οι προοπτικές ακριβούς διάκρισης μεταξύ σχεδόν ισομεγεθών τμημάτων περιορίζονται πολύ, όπως και οι επιλογές πηκτωμάτων. Κανένα δεν έχει ΔΙ για τμήματα άνω των 600 ζ.β. και ακόμη και σε αυτήν την τιμή η ΔΙ είναι εξαιρετικά χαμηλή, επιτρέποντας διάκριση σε μεγάλες σχετικές διαφορές μεγεθών.

Οι διαφορές μεταξύ των αποκλίσεων σε συγκεκριμένο πηκτώμα δείχνουν ένα πρακτικό κριτήριο καταλληλότητας για εφαρμογές σε ηλεκτροφορήσεις τμημάτων DNA συγκεκριμένου μεγέθους, παρά τις θεωρητικές επιδόσεις που προσδιορίζονται από τις συγκρίσεις των μεγεθών που προκύπτουν από την συμπεριφορά του ενδείκτη μοριακών μεγεθών. Ενώ τα κινητικά μεγέθη μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να επιλεγεί η ορθή συγκέντρωση για την συγκριτική και ποιοτική διάκριση των αποτελεσμάτων, η ποσοτικοποίηση πιθανόν απαιτεί διαφορετικό κριτήριο επιλογής. Μέχρι στιγμής η συντριπτική πλειοψηφία των εφαρμογών ηλεκτροφόρησης στατικού πεδίου αρκούνται σε μια ενδεικτική και συγκριτική παράθεση δεδομένων (9, 10, 11, 17, 18), και αυτό ως απλή επιβεβαίωση ή ποιοτικό έλεγχο κάποιας, τυπικά ενισχυτικής, διαδικασίας, η οποία συνήθως ερμηνεύεται σε δυαδικό πρότυπο (παραγωγή ή μη προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους). Αυτή η πρακτική αφ' ενός οδηγεί σε περιορισμένου μεγέθους ζώνες, συμβατές με τη δυναμική της ενισχυτικής τεχνικής. Αφ' ετέρου όμως η διαφοροποίηση μεγέθους ή αλληλουχίας του παραγόμενου προϊόντος μπορεί να αξιολογείται, αυξάνοντας το πληροφοριακό περιεχόμενο της τεχνικής και δημιουργώντας απαιτήσεις ακριβούς εκτίμησης και ερμηνείας (10, 18).

Παρ' όλ' αυτά, η προτυποποίηση της ακρίβειας και η ανάπτυξη αντιστοίχων διαδικασιών, αν και χρονοβόρα, απαιτητική και ευπαθής σε πειραματικά σφάλματα, μπορεί να προσδώσει ποσοτικά δεδομένα σε απόλυτες τιμές, καταργώντας την ανάγκη για αλληλουχοποίηση, η οποία είναι ο αρχετυπικός τρόπος ακριβούς προσδιορισμού μεγεθών. Η αλληλουχοποίηση δεν γίνεται από όλα τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν μοριακή μεθοδολογία και είναι σχετικώς ακριβή σε επαναλαμβανόμενα και μη επαναλαμβανόμενα κόστη, και ενίοτε θεωρείται ασύμφορη, όταν απλώς απαιτείται ο προσδιορισμός μήκους ενός τμήματος. Για το λόγο αυτό αναπτύσσονται εναλλακτικές μεθοδολογίες προκειμένου να καλυφθούν οικονομικότερα λιγότερο απαιτητικές ανάγκες, όπως η SSCP (Πολυμορφισμός Μονοκλωνικής Διαμόρφωσης) και η REA (Ανάλυση δια Περιοριστικών Ενζύμων). Ο πρώτος εντοπίζει ύπαρξη οποιασδήποτε διαφοράς στην νουκλεοτιδική αλληλουχία δύο τμημάτων DNA χωρίς απαίτηση εντοπισμού της διαφοράς ή γνώσης των αλληλουχιών (6). Η δεύτερη επιτρέπει την ανίχνευση διαφορών αλληλουχίας σε συγκεκριμένες θέσεις εύρους ανάλογου με το επιλεγόμενο ένζυμο (9, 10, 18). Σε περίπτωση που τα δείγματα που απαιτούν υπολογισμό μεγέθους σταλούν σε συνεργαζόμενο εργαστήριο ή κέντρο, εκτός του οικονομικού θέματος προκύπτει και το θέμα της καθυστέρησης για την μετάβαση και το χειρισμό και διεκπεραίωση, κάτι πολύ σημαντικό σε χρονικώς κρίσιμες εξετάσεις, όπως επιτήρησης /Δημόσιας Υγείας/ Ποιοτικού Ελέγχου/ Σήμανσης.

Είναι πολύ ενδιαφέρουσα η φύση των σφαλμάτων που υποβαθμίζουν την ακρίβεια των πηκτωμάτων. Σε κάποιες περιπτώσεις έγιναν υποθετικές εναλλακτικές χαράξεις πρότυπης καμπύλης με απαλοιφή ορισμένων τιμών του ενδείκτη μοριακών μεγεθών, προκειμένου να ελεγχθεί η μεταβολή των επιδόσεων ακρίβειας. Αποδείχθηκε ότι, καθώς η πρότυπη καμπύλη χارασσόταν με τη μέθοδο της μέσης γραμμής από τις μετρήσεις των ζωνών του ενδείκτη, η απαλοιφή των τιμών που παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη Τυπική Απόκλιση δεν βελτίωνε, αλλά χειρότερευε την ακρίβεια. Αντιθέτως, απαλοιφή τιμών με πολύ μικρή Τυπική Απόκλιση βελτίωνε την ακρίβεια. Η φυσική ερμηνεία του φαινομένου είναι ότι οι μετρήσεις αποστάσεων που διανύουν οι μεγαλύτερου μεγέθους ζώνες είναι πειραματικά, ή έστω υπολογιστικά, περισσότερο ανακριβείς λόγω της μικρής διανυόμενης απόστασης και της εν γένει περιορισμένης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των ζωνών. Άσχετα με το αν αυτά τα σφάλματα είναι σταθμισμένα ή όχι, ο αριθμός των ζωνών αυτών ως προς το σύνολο των ζωνών που λαμβάνονται υπόψη δημιουργεί μια στατιστική ψευδοσημαντικότητα, η οποία όχι μόνο επηρεάζει την κλίση της καμπύλης και ως εκ τούτου την ακρίβεια, αλλά επιπλέον δημιουργεί αυξημένη τυπική ψευδοαπόκλιση, με αποτέλεσμα την απόρριψη, κατά τη συνήθη στατιστική πρακτική, τιμών (κυρίως προερχόμενων από τις μικρότερου μήκους ζώνες του ενδείκτη) που παρουσιάζουν αυξημένη τυπική απόκλιση από την μέση καμπύλη, οι οποίες όμως αποδεικνύονται ορθότερες πειραματικά από τις πληθικά περισσότερες τιμές των μεγαλύτερων ζωνών, οι οποίες έχουν και μικρότερες τυπικές αποκλίσεις.

Αυτό καθίσταται εμφανές από την κάθετη πτώση της ακρίβειας που παρουσιάζει το πήκτωμα 1,6%, στο οποίο δεν είχε εντοπιστεί η ζώνη των 100 ζ.β., η οποία εκ συστήματος εμφανίζεται να βελτιώνει την ακρίβεια της πρότυπης καμπύλης. Αυτό όμως φαίνεται να ισχύει από μια ελάχιστη συγκέντρωση αγαρόζης, καθώς η απώλεια έτι περισσότερων, και μάλιστα μικρού μεγέθους ζωνών ζωνών στο πήκτωμα 0,5% δεν δείχνει να υποβαθμίζει δραστικά την ακρίβειά του. Πιθανώς αν αυτές είχαν μελετηθεί, η παρατηρούμενη ακρίβεια να ήταν πολύ μεγαλύτερη, αλλά σε κάθε περίπτωση σε αυτή τη συγκέντρωση οι μετρήσεις από τις μεγαλύτερες ζώνες δίνουν επαρκή ακρίβεια. Αντίθετα, η απώλεια μίας ζώνης στο πήκτωμα 0,8% υποβαθμίζει την επίδοση ακριβείας του και ίσως εκεί πρέπει να αναζητηθεί το σημείο καμψής στην επίδραση της συγκέντρωσης της αγαρόζης στην ποιότητα και ακρίβεια της πρότυπης καμπύλης. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν σε σκέψεις επιλογής συγκεκριμένων ζωνών του ενδείκτη για χάραξη πρότυπης καμπύλης για πηκτώματα συγκεκριμένης συγκέντρωσης, ανάγκη που ίσως εξυπηρετείται με ενδείκτες ασταθούς βήματος. Μια τέτοια προσέγγιση φυσικά δυσχεραίνει την διεργαστηριακή σύγκριση αποτελεσμάτων και την πειραματική τυποποίηση, παράγοντες που τελευταία φαίνεται να λαμβάνουν μεγάλη σημασία (1), ιδίως για εφαρμογές που ενέχουν τη διάσταση του ποιοτικού ελέγχου. Πιθανή μελλοντική επέκταση της μελέτης προφανώς θα μπορούσε να περιλάβει πολλαπλές ηλεκτροφορήσεις σε πηκτώματα συγκεκριμένης συγκέντρωσης με διαφόρων, γνωστών μεγεθών προϊόντα (PCR και περιοριστικών πένσεων) και ενδείκτες ασταθούς και σταθερού βήματος, για προσδιορισμό των παραμέτρων που βελτιστοποιούν υπολογιστικά την ακρίβεια των πειραμάτων. Μια τέτοια προοπτική μακροπρόθεσμα θα οδηγούσε σε ολοκληρωμένα πρωτόκολλα που πλην του πειραματικού μέρους θα περιλαμβάνουν αλγορίθμους αξιολόγησης εικόνας για εφαρμογές ηλεκτροφόρησης στατικού πεδίου, με αποτέλεσμα σημαντική κανονικοποίηση και τυποποίηση αποτελεσμάτων σε πολύ μεγάλο αριθμό εργαστηρίων που δεν είναι εξειδικευμένα στις προηγμένες, εξεζητημένες και πολύπλοκες μοριακές μεθοδολογίες αλλά ικανοποιούνται, στο πλαίσιο του ερευνητικού ή παραγωγικού τους έργου κάποιες απλές εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης στατικού πεδίου.

Επιπλέον, θεωρούμε ότι διαφορετικές συμβάσεις κανονικοποίησης και κριτηρίων (ως προς την επιλογή και τη βαρύτητα των περιγραφικών μεγεθών), μαθηματικής επεξεργασίας και καθορισμού μεγεθών θα μπορούσαν να προσδώσουν επιπλέον δυνατότητες εκμετάλλευσης των ηλεκτροφορητικών αποτελεσμάτων, εξόρυξης δεδομένων από αυτά και πιθανώς βελτίωσης των συνθηκών και των αλγορίθμων χρήσης τους, αυξάνοντας τόσο την χρηστικότητα όσο και την οικονομική αποδοτικότητα των ηλεκτροφορήσεων.

Βιβλιογραφία

1. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O'Donnell K, Petti CA, Rodriguez-Tudela JL, Sutton D, Velegraki A, Wickes BL. (2008) Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol*. [Epub ahead of print]
2. Βελεγράκη Α. και Καμπούρης Μ. Ε. (2003) «Μικροσυτοιχίες και Πολυπλεκτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης: Επαναστατικές μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας με εφαρμογές στην Βιοϊατρική Πράξη» *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*, 20(4): 425-445.
3. Corley RB (2005) *A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*, 1st ed. Springer, USA, ISBN 0-387-22844-6.
4. Dunphy JC, Busch JKL, Buchanad MV (1993) "Rapid Extraction and Structural Characterization of Biomolecules in Agarose Gels by Laser Desorption Fourier Transform Mass Spectrometry" *Analytical Chemistry*, 65:1329-1335,
5. Flickinger MC, Drew SW (1999) "*Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*" Wiley-Interscience, USA, ISBN 0-471-13822-3).
6. Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. (2006) Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. *Br J Dermatol.*;154: 854-9.
7. Hickey JD, Heller L, Heller R, Gilbert R (2007) "Electric field mediated DNA motion model" *Bioelectrochemistry*, 70:101-103.
8. Hilal H, Taylor JA (2008) "Cyanine dyes for the detection of double stranded DNA" *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70:1104-1108.
9. Kambouris M. E., Reichard U., Legakis N. J. and Velegraki A. (1999) "Sequences from the aspergillopepsin *PEP* gene of *Aspergillus fumigatus*: Evidence on their use in selective PCR

- identification of *Aspergillus* species in infected clinical samples". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 25, 255-64.
10. Καμπούρης Μ. Ε, Βελεγράκη Α., Λεγάκης Ν. Ι. (2000) "Διαφορική διάγνωση νηματοειδών μυκήτων με άπαξ περιοριστική πέψη προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης". *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής* 17: 171-179.
 11. Kusakawa N, Ostrovsky MV, Garner MM (1999) "Effect of gelation conditions on the gel structure and resolving power of agarose-based DNA sequencing gels" *Electrophoresis* 20:1455-1461.
 12. Lin CY, Ching YT, Yang YL (2007) "Automatic Method to Compare the Lanes in Gel Electrophoresis Images", *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 11(2):179-189.
 13. Mattos De JCP, Dantas FJS, Caldeira-de-Arau A, Moraes MO (2004) "Agarose Gel Electrophoresis System in the Classroom" *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 32(4):254-257.
 14. Sambrook J, Russel DW (2001) "*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*" 3rd ed., Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA ISBN 0879695773.
 15. Stift G, Pachner M, Lelley T (2003) "Comparison of RAPD Fragment Separation in Agarose and Polyacrylamide Gel by Studying *Cucurbita* Species" *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 26:62-65.
 16. Upcroft P, Upcroft JA (1993) "Comparison of properties of agarose for electrophoresis of DNA" *Journal of Chromatography*, 618(1-2):79-93.
 17. Velegraki A., Kambouris M. E., Kostourou A., Chalevelakis G. and Legakis N. J. (1999). "Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification". *Medical Mycol.* 37, 69-73.
 18. Velegraki A., Kambouris M. E., Skiniotis G., Savala M., Mitroussia- Ziouva A. and Legakis N. J. (1999) "Identification of medically significant fungal genera by Polymerase Chain Reaction followed by Restriction Enzyme Analysis". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23, 303-12.
 19. Viljoen CD, Wingfield BD, Windfield MJ (1993) "Agar an alternative to agarose in analytical gel electrophoresis" *Biotechnology Techniques*, 7(10):723-726.
 20. Voytas D. (2003) "Agarose gel electrophoresis" *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Unit2, 5A, John Wiley & Sons Inc, USA ISBN 047150338X
 21. Wang H.-Y., Luo M., Tereshchenko I., Frikker D.M., Cui X., Li J.Y., Hu C., Yi C., Azaro M., Lin Y., Shen L., Yang Q., Kambouris ME, Gao R, Shih W. Li H. (2005) "A genotyping system capable of simultaneously analyzing 1,000 Single Nucleotide Polymorphisms in a haploid genome", *Genome Research* 15 (2): 276-89.
 22. Westermeier R. (2005) "*Electrophoresis in Practice*", 4th Ed, Willey-VCH, USA, ISBN 3-527-31181-5.
 23. Yarmush ML, Toner M, Plonsey R, Bronzino JD (2003) *Biotechnology for Biomedical Engineers*, 1st ed., CRC Press LLC, USA, ISBN 0-203-00903-7.

VARIABLE CONCENTRATION OF AGAROSE GELS AND DISTINCT APPLICABILITY CRITERIA

**Zachariou Angelina¹, Pandis Spyridon¹, Velegraki Aristeia² and
Kambouris Manousos E.¹**

¹Dept of Medical Laboratories, Fcty of Health and Caring Professions, Technological Educational
Institute of Athens, Ag Spyridonos st., 12210 Athens, GREECE.

² Mycology Laboratory, Medical School, National & Kapodistrian University of Athens
75-77 Mikras Asias st., 11527 Athens, GREECE

Abstract

The purpose of this experiment was to study the discriminatory capacity and other functional parameters of varying agarose gel concentrations, and to create a documented classification according to concentration and ability to separate DNA fragments of various sizes with analytical efficiency.

The experiment utilized agarose-TBE gels at concentrations of 0.5%, 0.8%, 1.2%, 1.6%, 2%, 2.5%, 3% and 3.5%. Electrophoresis was performed using randomly selected amplicons from fungal PCR reactions and a molecular marker (100-bp DNA ladder). Each electrophoresis was normalized to the migrating first loading buffer dye, bromophenol blue, reaching the bottom of the gel.

The gels were photographed and widely available computer software tools (Microsoft Excel, Microsoft Word) were utilized to compile mobility - band size standard curves for each gel and resulted in charts indicating the alteration of electrophoretic properties in correlation with concentration. Specifically, the co-migration of DNA ladder bands and the loading buffer dyes was examined, and the Discriminatory Power, the Resolution Spectrum, and other correlated measurements and parameters were defined, calculated for each gel, and plotted for the whole gel range.

Based on the results, we suggest the use of varying gel concentrations, according to the application sought and the prospective, expected or known fragment size to undergo electrophoresis.

Keywords: *agarose gel electrophoresis, standard curve, DNA mobility, discriminatory power*