
**DNA GEL ELECTROPHORESIS – A METHOD RELATED TO PCR AND INCLUDED
IN THE EDUCATIONAL PROGRAM OF A BULGARIAN LANGUAGE
PREPARATORY COURSE FOR FOREIGN STUDENTS**

Detelina Mileva

Medical University of Plovdiv, Bulgaria, detelina_mileva@abv.bg

Vesselin Alexandrov

Medical University of Plovdiv, Bulgaria, acionix@gmail.com

Abstract: Very often, Chemistry, Biochemistry and Biology are part of the essence of research methods. Continuously developing technologies with applications in Medicine, Dental medicine and Pharmacy attract students' attention. The inclusion of new innovative technologies and old but well established methodologies in the educational programs in Specialized Language Courses for foreign students at Medical University is well received by the students. The intertwining of various fields of science such as Biophysics, Biochemistry, Molecular biology in research methods intensifies their interest. The benefits of learning new biotechnologies and research approaches during training are beyond any doubt. In this way, students gain a real understanding of the application of established technologies and methods applied in medicine and pharmacy and their enormous importance in diagnosis and treatment. Our long experience shows that an interdisciplinary approach to chemistry and biology education helps to facilitate the learning of the material and to consolidate new knowledge.

The subject of this study is DNA gel electrophoresis. This is a method for separating macromolecules, the next step after the polymerase chain reaction (PCR) technique. Fragments synthesized by PCR are proven and separated by gel electrophoresis. The topic is included in the curriculum of foreign students from the Preparatory Course at the Medical University of Plovdiv. During the lesson, an interdisciplinary approach is applied with the help of chemistry and biology teachers. Students prepare individual presentations in advance. Different cases of medical practice and curious facts are discussed, which keep students' attention. The terms are introduced at an affordable level, accompanied by richly illustrated diagrams showing the steps of the method. Although the students of the Preparatory course do not have long language practice and a rich stock of words and terminology, this method of teaching helps to make the learning material easier to understand and learn. The interest in the subject is heightened. For students who are interested in experimental work, visits to the University's science laboratories and familiarization with the equipment are provided. They have the opportunity to join special courses in the Departments of Biology and Chemistry under the guidance of highly qualified specialists. More advanced students, together with their teachers, can prepare for research and participate in scientific forums.

Keywords: DNA Gel Electrophoresis, education of students from Language Preparatory Course, Biology, Chemistry, Biochemistry

**ДНК ГЕЛ ЕЛЕКТРОФОРЕЗА – МЕТОД, СВЪРЗАН С РСР, ВКЛЮЧЕН В
ОБУЧЕНИЕТО ПО БИОЛОГИЯ И ПО ХИМИЯ В ПОДГОТВИТЕЛЕН КУРС НА
БЪЛГАРСКИ ЕЗИК ЗА ЧУЖДЕСТРАННИ СТУДЕНТИ**

Детелина Милева

Медицински университет Пловдив, България, detelina_mileva@abv.bg

Веселин Александров

Медицински университет Пловдив, България, acionix@gmail.com

Резюме: Много често химията, биохимията и биологията са част от същността на научно-изследователските методи. Непрекъснато развиващите се технологии с приложение в медицината, денталната медицина и фармацията привличат вниманието на студентите. Включването на нови иновационни технологии и стари, но утвърдени методики в учебните програми на студенти от специализираните подготвителни езикови курсове за чуждестранни студенти в Медицински университет се приема добре от обучаемите. Самото преплитане на различни области на науката като биофизика, биохимия, молекулярна биология в изследователските методи засилва техния интерес. Ползата от изучаването на нови биотехнологии и научно-изследователски подходи по време на обучението не подлежи на съмнение. По този начин студентите придобиват реална представа за приложението на утвърдените технологии и методи в медицината и фармацията и огромното им значение при диагностиката и лечението. Дългогодишният ни опит показва, че

интердисциплинарният подход при обучението по химия и биология помага за по-лесното усвояване на учебния материал и затвърждаване на новите знания.

Обект на тази разработка е „ДНК гел електрофореза“. Това е метод за разделяне на макромолекули, естествено продължение на техниката „Полимеразна верижна реакция (PCR)“. Фрагментите синтезирани чрез PCR се доказват и разделят с помощта на гел електрофореза. Темата е включена в учебната програма на чуждестранните студенти от Подготвителния курс при Медицински университет Пловдив. По време на обучението се прилага интердисциплинарен подход с помощта на преподавателите по химия и биология. Студентите предварително подготвят самостоятелни презентации. Дискутират се различни случаи от медицинската практика и любопитни факти, което задържа вниманието на студентите. Термините се въвеждат на достъпно ниво, като са придружени с богато илюстрирани схеми, показващи различните етапи на метода. Въпреки, че студентите от подготвителния курс нямат продължителна езикова практика и богат запас от думи и терминология, този начин на преподаване помага за по-лесното разбиране и усвояване на учебния материал, а интересът към темата е завишен.

За студенти, които имат интерес към експериментална работа се осигуряват посещения в научните лаборатории на университета и запознаване с апаратурата. Те имат възможност да се включат в специални кръжоци към катедрите по биология и химия под ръководството на високо квалифицирани специалисти. По-напредналите студенти заедно с преподавателите могат да подготвят научни разработки и да участват в научни форуми.

Ключови думи: ДНК гел електрофореза, обучение на чуждестранни студенти от подготвителен курс, биология, биохимия, химия

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Динамиката на процесите в света, в който живеем, се дължи на непрекъснато развиващите се наука и технологии, тласкащи напред развитието на човешката цивилизация. Медицината като дял от науката също се развива с бързи темпове. Откриват се нови възможности за извършването на дистанционни роботизирани операции без сложни хирургически интервенции, при които периодът на възстановяване драстично се съкращава. Методите за лечение стават все по-ефективни с помощта на разработените нови лекарствени форми. Всичко това допринася за удължаването на човешкия живот като цяло. Теорията и практиката са две части на едно цяло. Чрез практиката, придобитите теоретични познания се усвояват по-лесно и се затвърждават. Затова в програмите по биология и по химия за чуждестранни студенти от Подготвителния курс на ДЕСО са включени уроци с практическа насоченост. Застъпени са няколко изследователски метода, които имат приложение в медицинските анализи и изследвания. Те имат голямо значение при диагностиката на различни заболявания и за лечението им. По време на уроците студентите обогатяват знанията си и научават нови термини. Реално виждат как теорията се прилага чрез практиката и по-лесно разбират и осъзнават значението и приноса на тези научно-изследователски методи за медицинската наука. Един от основните методи с огромно приложение в научните изследвания е ДНК гел електрофорезата. За първи път през 1809 г. двама руски учени от Московския университет „М. Ломоносов“ Страхов и Рейсе установяват, че молекули, разтворени в течности, могат да се придвижват от единия полюс към другия под действието на приложено електрическо напрежение. По-късно през XVIII век Хиторф, Нернст и Колрауш провеждат подобни експерименти за свойствата и поведението на йони, движещи се през водни разтвори под въздействието на електрическо поле и разработват някои от основните уравнения на електрохимията. За откривател на съвременната електрофореза се счита Арне Тиселиус. През 1931 г. той изобретява уред за електрофоретични анализи на колоидни смеси, който впоследствие е наречен „Апарат на Тиселиус“. През 1948 г. шведският учен е удостоен с Нобеловата награда за химия за приноса му в адсорбционните анализи и електрофорезата. Както всеки научно-изследователски метод, така и електрофорезата непрекъснато се усъвършенства. В зависимост от разнообразните приложения, за които се използва, през годините са разработени много различни модификации: агарозна или полиакриламидна (PAGE) електрофореза, в зависимост от вида на използвания гел, хоризонтална или вертикална, в зависимост от положението на гела в пространството, капилярна, имунохимическа, двуизмерна (2D), с висока разделителна способност (high resolution), с изоелектрично фокусиране (IEF), с променящо се електромагнитно поле (PFGE, pulsed field) с микрофлуиден чип и др.

2. ИЗЛОЖЕНИЕ

В друга наша разработка сме описали начина на преподаване в Подготвителния курс на ДЕСО на тема, включваща научно-изследователския метод „Полимеразна верижна реакция (PCR)“. Темата за „ДНК гел електрофореза“ е тясно свързана с тази за PCR и е включена в програмата по биология и химия. Студентите

предварително са запознати с темата. Те са разделени на две или три групи и представят кратки 3-5 минутни презентации, включващи основната терминология на метода. Урокът продължава с кратко разяснение къде се използва този метод. Едно от най-честите приложения на гел електрофорезата е, когато тя се използва за разделяне на ДНК фрагменти след извършена амплификация чрез PCR. В други случаи техниката е част от пробоподготовката преди използването на други аналитични методи като маспектрометрия, клониране, ДНК секвениране, Southern блотинг и др.

Въпреки, че е открита доста отдавна, гел електрофорезата си остава предпочитан метод за разделяне на ДНК фрагменти, получени след PCR. За да придобият представа за разнообразните приложения на този метод пред студентите се изброяват няколко примера от научни разработки, направени през последната година: Някои полиморфизми (SNP) в гена MDR1 са свързани с епилепсия при деца, други полиморфизми в гена FTO са свързани с диабет, а трети в гена EphA1 – с Алцхаймер. ДНК фрагментите на различните SNP се разделят с гел електрофореза след PCR. Гел електрофореза е използвана при генотипиране на различни шамове *Staphylococcus aureus* или на пациенти с Папилома вирус, който се свързва с рак на матката. Методът си остава предпочитан при измерване дължината на ДНК фрагменти получени след изрязването им с рестрикционни ензими от вектори. ДНК фрагменти от различни фенотипове пациенти, свързани с индекса за пушене, различен начин на живот и геномна нестабилност също са разделени чрез този метод. Гел електрофореза е използвана за анализиране на флуорофори с различен източник на излъчване, приготвени от лимонена киселина и етилендиамин, като са направени изводи за произхода на фотолуминисценцията. Техниката е използвана и за разделяне на фрагменти от ДНК на различни видове салмонела, изолирани от храни. Споменатите приложения не са за заучаване, а само да се обърне внимание на изключителните възможности на метода и приноса му за по-лесното диагностициране на различни болести.

За да се засили интереса на студентите и да подчертае още веднъж колко е разпространен и популярен методът в областта на научните изследвания се отбелязва един любопитен факт: като се напише „гел електрофореза“ в търсачката на сайта PubMed излизат над 300 000 публикации от областта на медицината, в които методът се използва.

Когато е извършена амплификация чрез PCR, много често в пробите има повече от един ДНК фрагмент. Например при отрязване на няколко ДНК фрагмента от плазмиден вектор с помощта на рестрикционни ензими. За определяне на тяхната дължина или за други следващи анализи е необходимо тези фрагменти да се разделят. Те реално са микроскопични части от ДНК молекула и са под формата на смес в една малко епруветка с обем от 0.2 µl. Как да стане това разделяне? Тогава на помощ идва гел електрофорезата.

Следва представяне на същността на метода, чрез който могат да се разделят ДНК фрагменти. Припомнят се някои термини от предишни уроци като гел, буфер, нуклеотидни двойки, анод, катод и др.

Какво ни е необходимо за да извършим гел електрофореза?

1. **Проба** – съдържа търсените ДНК фрагменти

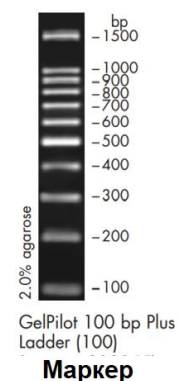
2. **Маркер** – служи като матрица за определяне дължината на фрагментите. Съдържа смес от различни по дължина ДНК фрагменти, които се разпределят в гела като стълба, по която се сравняват останалите.

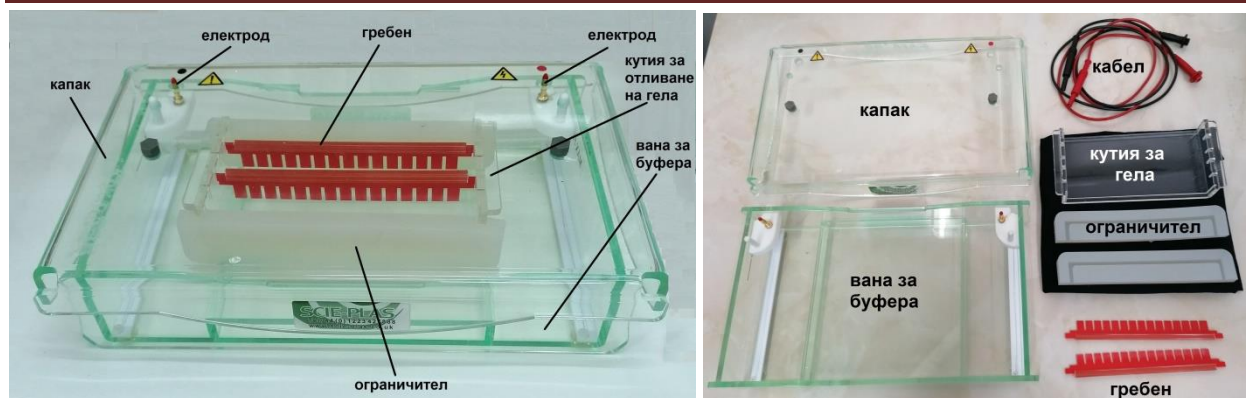
3. **Гел** – това е субстратът, през който се движат фрагментите. Най-често за разделяне на ДНК фрагменти се използват агарозни гелове, а за протеини по-подходящи са полиакриламидните гелове.

4. **Буфер** – той осигурява йони, които са необходими за преминаването на електричеството и за поддържане на постоянно рН в системата. Най-често използваните буфери са Tris-Acetate-EDTA (TAE) или Tris-Borate-EDTA (TBE).

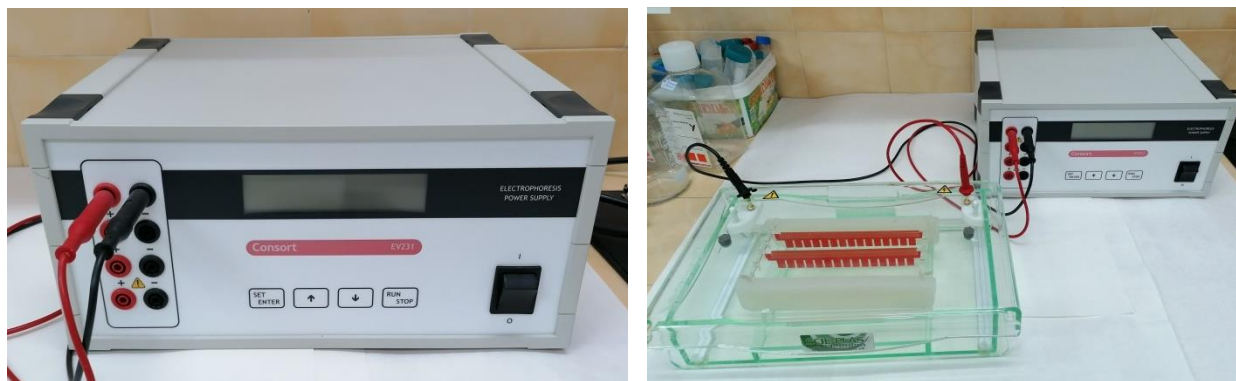
5. **Етидиев бромид (EtBr)** – класическият оцветител за визуализиране на ДНК фрагменти след разделяне с гел електрофореза. Интеркалира между азотните бази на двойната верига на ДНК. Когато е облъчвано с UV светлина, багрилото флуоресцира с оранжев цвят. Излъчването се засилва до 20 пъти след свързване с ДНК. Недостатъкът на EtBr е, че е силен мутаген. Винаги трябва да се работи с ръкавици. Заместители: Methylene blue, Crystal violet, SYBR Safe, Gel Red, Coomassie Brilliant Blue – всички са по-слаби мутагени от EtBr.

6. **Апарат за електрофореза** – системата съдържа пластмасова ваничка за буфера, кутия за отливане на гела с ограничители, гребенчета за гнездата (кладенчетата) за пробите, вградени електроди, кабели за захранването и капак.





7. **Захранващо устройство** – апарат, който осигурява постоянни параметри на приложения електрически ток за зададеното време.



Всяка точка се дискутира и ако е необходимо се дават допълнителни разяснения. Показват се снимки и схеми за по-лесно възприемане на новата терминология.

Какво още трябва да знаем преди да започне процеса?

1. Принцип на метода: молекули, притежаващи заряд се движат през гел, потопен в буфер под действието на електрически ток с определени параметри.

2. При отливането на гела, гребенчетата се поставят така, че кладенчетата да се получат близо до отрицателния полюс (катод). Тъй като ДНК молекулите са отрицателно заредени, след включване на захранването, те се придвижват по цялата дължина на гела към положителния полюс (анод).

3. Фрагменти с еднаква дължина се придвижват в гела с една и съща скорост. Например, ако търсения фрагмент е с дължина 500 нуклеотидни двойки, той се движи със същата скорост, с която се движи групата фрагменти от маркера с дължина 500 нуклеотидни двойки. След завършване на процеса двете ивици (на маркера и на търсения фрагмент) трябва да са на едно и също разстояние от началната точка

4. Структурата на гела е нещо като преплетени микроскопични пори, тунели и канали, образувани между агарозните молекули и през тях се движат фрагментите под действието на електрически ток. Малките фрагменти по-лесно преминават през тунелите и се движат по-бързо от големите, които се движат по-бавно, защото преминават по-трудно.

5. Докато протича ток през системата, фрагментите се движат. Ако по някаква причина електричеството не се спре навреме, фрагментите ще достигнат края на гела и ще излязат от него в буфера.

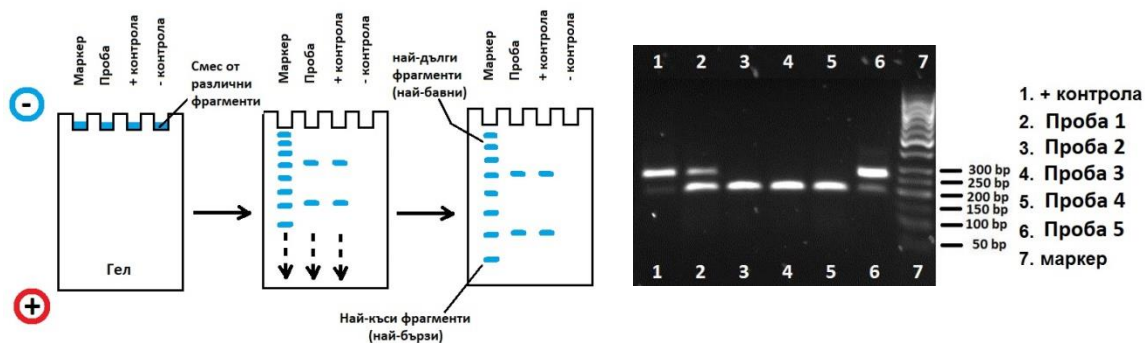
6. Дължината на търсените фрагменти трябва да съвпада с дължината на фрагментите в положителните контроли. Пред кладенчето на отрицателната контрола не трябва да има никакви ивици.

Всяка точка се дискутира и ако е необходимо се дават допълнителни пояснения. По този начин новата терминология се усвоява по-лесно.

След това подробно се разясняват основните стъпки на процеса:

1. Приготвяне на гел: агарозата се разтваря в определено съотношение с буфера, стопява се и се оставя да се охлади до 50°C. Добавя се EtBr и се излива в кутията за гела. Поставят се гребените и се оставя за 30 мин. да се втвърди.
2. Гребените се изваждат и гелът се залива с буфер.
3. В образуваните от гребените кладенчета се накапват пробите, контролите и маркера.
4. Поставя се капачка и електродите се свързват към захранващото устройство чрез кабелите.
5. Настройва се програма за параметрите на тока съгласно естеството на пробите.
6. Процесът се стартира и фрагментите започват да се движат към анода. Най-малките са най-бързи и ще отидат най-далеч. По-големите са по-бавни и изминават по-малко разстояние.
7. След около 30 мин. разделянето е завършено и при облъчване с UV светлина фрагментите под формата на флуоресциращи ивици могат да се наблюдават и заснемат.

Предоставените схеми за етапите при разделянето на фрагментите и снимки, направени след облъчване на фрагментите с UV светлина помагат за по-доброто усвояване на учебния материал, а паралелът между тях улеснява още повече процеса.



За поддържане на студентския интерес може да се добавят още няколко любопитни насоки в развитието на електрофорезата. Когато подлежащите на разделяне ДНК фрагменти са с много големи размери, те изключително трудно се придвижват през гела. Затова е разработена специална импулсна модификация на електрофореза, която се използва за разделяне на големи ДНК молекули чрез прилагане на електрическо поле, което периодично променя посоката си и по този начин помага за придвижването на фрагментите. Една от последните иновации в развитието на гел електрофорезата е комбинирането на този на пръв поглед прост физикохимичен метод с микроелектрониката. Електрофорезата с микрофлуиден чип вече е широко използвана за разделяне на различни биомакромолекули (нуклеинови киселини, протеини) или биохимични малки молекули (аминокиселини, метаболити, йони и др.) поради своите предимства – малки проби, ниска цена, бърз анализ.

И този урок завършва с показване на видеоклип, представящ всички стъпки на процеса. По време на гледането на клипа студентите придобиват по-реална представа за гел електрофорезата като изследователски метод, което затвърждава получените нови знания. В нашия университет има много научни лаборатории, където студентите могат да се запознаят отблизо с апаратурата, даваща възможност за прилагането на различни изследователски техники и научни експерименти, включително и гел електрофореза. Преподавателите по биология и по химия съвместно организират посещения в такива лаборатории, за да предоставят тази възможност на студентите.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

След края на обучението студентите имат реална представа за метода гел електрофореза като цяло и за тясната връзка между него и полимеразната верижна реакция. Те вече могат да осъзнаят колко широко и всеобхватно се прилага този метод в областта на медицинската наука и какъв е неговият принос. Урокът е интердисциплинарен и ангажира преподавателите по химия и по биология, което допринася за по-доброто усвояване на новата терминология. Новонаученото се затвърждава в по-голяма степен и служи като основа за придобиване на нови знания на по-високо ниво при обучението на студентите в горните курсове.

ЛИТЕРАТУРА

- Gao, L., Yin, X., Li, Y., Xiao, H., Yang, L., Fan, H., Qi, H., Zhang, J., Feng, J., Zheng, F., (2019), „Association of MDR1 gene polymorphisms with refractory epilepsy in children“, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2019 Nov 10;36 (11):1073-1076.
- He Y, Reed S, (2019), „Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Staphylococcus aureus Strains“. *Methods Mol Biol*. 2020;2069:79-88.
- Heintz N, Gong S., (2019), „Examination of Bacterial Artificial Chromosome (BAC) DNA Quality and Quantity by Pulsed-Field Gel Electrophoresis“. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019 Nov 1;2019(11):pdb.prot098020.
- Herschleb, Jill; Ananiev, Gene; Schwartz, David C (2007). "Pulsed-field gel electrophoresis". *Nature Protocols*. 2 (3): 677–684.
- Kabir A, Bukar M, Nggada HA, Rann HB, Gidado A, Musa AB, (2019), „Prevalence of human papillomavirus genotypes in cervical cancer in Maiduguri, Nigeria“. *Pan Afr Med J*. 2019 Aug 5;33:284.
- Kaufmann, Mary Elizabeth (1998). "Pulsed-Field Gel Electrophoresis". 15: 33–50.
- Kokorina AA, Bakal AA, Shpuntova DV, Kostritskiy AY, Beloglazova NV, De Saeger S, Sukhorukov GB, Sapelkin AV, Goryacheva IY, (2019), „Gel electrophoresis separation and origins of light emission in fluorophores prepared from citric acid and ethylenediamine“. *Sci Rep*. 2019 Oct 11;9(1):14665.
- Locken-Castilla A, Pacheco-Pantoja EL, Rodríguez-Brito F, May-Kim S, López-Rivas V, Ceballos-Cruz A, (2019), „Smoking index, lifestyle factors, and genomic instability assessed by single-cell gel electrophoresis: a cross-sectional study in subjects from Yucatan, Mexico“, *Clin Epigenetics*. 2019 Oct 29;11(1):150.
- Naaz, K., Kumar, A., Choudhury, I., (2019), „Assessment of FTO Gene Polymorphism and its Association with Type 2 Diabetes Mellitus in North Indian Populations“. *Indian J Clin Biochem*. 2019 Oct;34(4):479-484.
- Ou X, Chen P, Huang X, Li S, Liu BF, (2019), „Microfluidic chip electrophoresis for biochemical analysis“. *J Sep Sci*. 2019 Oct 26. doi: 10.1002/jssc.201900758.
- Sambrook, J., Russell, D. W., (2001), „Molecular cloning: a laboratory manual“, 3rd. ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, c 2001.
- Talebi, M., Delpak, A., Khalaj-Kondori, M., Sadigh-Eteghad, S., Talebi, M., Mehdizadeh, E., Majdi, A., (2019), „ABCA7 and EphA1 Genes Polymorphisms in Late-Onset Alzheimer's Disease“, *J Mol Neurosci*. 2019 Oct 28. doi: 10.1007/s12031-019-01420-x.
- Tiselius, A., (1937). "A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures". *Transactions of the Faraday Society*. 33: 524–531
- Yang J, Zhang Z, Zhou X, Cui Y, Shi C, Shi X, (2019), „Prevalence and Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolates from Retail Foods in Shanghai, China“. *Foodborne Pathog Dis*. 2019 Sep doi: 10.1089/fpd.2019.2671.