### Διαχωρισμος τεμαχιων Νουκλεινικών οξεων με ηλεκτροφορεση σε πηγματα αγαροζης

Ο πολυσακχαρίτης αγαρόζη αποτελείται από νήματα πολυμερισμένης γαλακτόζης και του ανυδρίου αυτής. Όταν θερμανθεί σε θερμοκρασίες άνω των 90οC σε υδατικά διαλύματα, τήκεται. Με ελάττωση της θερμοκρασίας κάτω από τους 65οC, το τήγμα αρχίζει να στερεοποιείται σχηματίζοντας ένα ημιδιαφανές πήγμα προσλαμβάνον το σχήμα του δοχείου πού το περιέχει. Τα μόρια DNA και RNA μπορούν να κινούνται διαμέσου των πόρων του στερεοποιημένου δικτύου των μορίων της αγαρόζης, υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου με ταχύτητα v, πού δίδεται από τον τύπο:

 **ln v = ln vο - k r τ**

vo = ταχύτητα του τεμαχίου εν απουσία αγαρόζης

 k = σταθερά

 r = μοριακό βάρος του τεμαχίου του νουκλεϊνικού οξέως

 τ = συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήγμα

Τα μεγαλύτερα επομένως μόρια νουκλεϊνικών οξέων κινούνται αργότερα. Κυκλικά μόρια νουκλεϊνικών οξέων, άθικτα ή ακόμη και με εγκοπές σε ένα από τα δύο νήματα (nicked), κινούνται ταχύτερα από τα αντίστοιχα γραμμικά μόρια του ιδίου μοριακού βάρους.

Αγαρόζη τροποποιημένη με ακετυλίωση, παραμένει σε υγρή μορφή μετά την τήξη της σε θερμανθέντα υδατικά διαλύματα, μέχρι και σε θερμοκρασίες 30οC. Ονομάζεται αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως (low melting point agarose). Αγαρόζη τύπου ΙΙ περιέχει και μόρια αγαρόζης με θειϊκές ομάδες, τα οποία μερικώς εξέρχονται μαζί με τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων κατά την εξαγωγή των τελευταίων από την αγαρόζη, μετά την ηλεκτροφόρεση. Οι επιθειομένοι αυτοί πολυσακχαρίτες μπορούν να παρεμποδίσουν μερικά από τα ένζυμα στις αντιδράσεις των νουκλεϊνικών οξέων, όπως για παράδειγμα τις λιγάσες, τις πολυμεράσες και τις ενδονουκλεάσες περιορισμού.

#### Διαχωρισμός τεμαχίων DNA.

1. Σε μία κωνική φιάλη, αναμιγνύεται ένα ποσό αγαρόζης σκόνης με διάλυμα ηλεκτροφόρεσης. Θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων ή με συνεχή ανάδευση σε μία πλάκα θερμάνσεως, έως ότου η αγαρόζη λιώσει εντελώς.

 *Ο όγκος του χρησιμοποιημένου διαλύματος ηλεκτροφόρεσης εξαρτάται από τις διαστάσεις του πήγματος. Η λιωμένη αγαρόζη εξαπλώνεται σε μία ανοικτή εξέδρα τετραγώνου ή παραλληλεπιπέδου σχήματος, ώστε να σχηματίσει ένα στρώμα πάχους περίπου 0.5 cm και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Ο όγκος επομένως του διαλύματος εξαρτάται από τις διαστάσεις της εξέδρας. Για να παραχθεί ένα πήγμα πλάτους 10 cm, μήκους 15 cm και πάχους 0.5 cm, θα χρειασθούν 10x15x0.5=75 cm3 διαλύματος λιωμένης αγαρόζης. Τα συνήθη πήγματα είναι αυτών των διαστάσεων, αλλά για μία γλήγορη ηλεκτροφόρεση ολίγων δειγμάτων, μικρά πήγματα 5cm x 5cm x 0.3cm = 4.5 cm3 μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η συνήθης συγκέντρωση της αγαρόζης είναι στο πήγμα είναι 0.7-0.8% w/v, όταν αναλύονται τεμάχια DNA, 1-1.5% w/v όταν αναλύονται μόρια RNA, και 1.5-2% w/v όταν αναλύονται προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Σε γενικές γραμμές, η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης αγαρόζης στο πήγμα και μεγέθους των μορίων των νουκλεϊνικών οξέων πού μπορούν να διαχωρισθούν δεικνύεται παραπλεύρως.*

 *Τα διαλύματα ηλεκτροφορήσεως, τα οποία χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του πήγματος αγαρόζης έχουν όλα pH περίπου 8. Παρασκευάζονται υπό συγκεντρωμένη μορφή, δεκαπλάσιας συγκέντρωσης (10X) από την χρησιμοποιούμενη, και αραιώνονται με αποστειρωμένο νερό για να χρησιμοποιηθούν στην ηλεκτροφόρεση. Παραδείγματος χάριν, για την κατασκευή ενός πήγματος αγαρόζης όγκου 70 ml, αναμιγνύονται 7 ml 10X διάλυμα ηλεκτροφόρεσης, 93 ml νερού και 0.7-0.8 gr αγαρόζης. Τρία είναι τα συνηθέστερον χρησιμοποιούμενα διαλύματα ηλεκτροφόρεσηs για ανάλυση DNA, η σύσταση των οποίων δίνεται παραπλεύρως.*

2. Η λιωμένη αγαρόζη αποχύνεται στο πλαίσιο στερεοποίησης και μία κτένα με δόντια διατομής 2mm x 5 mm τίθεται υπεράνω της αγαρόζης με τρόπο ώστε τα δόντια να εισχωρούν στην αγαρόζη απέχοντας όμως από το δάπεδο του πλαισίου κατά 1 περίπου mm.

 *Μετά την στερεοποίηση της αγαρόζης, η αφαίρεση της κτένας αφήνει εμβαθύνσεις (wells) σχήματος παραλληλεπιπέδου στα σημεία εμβύθυνσης των δοντιών. Στις εμβαθύνσεις αυτές θα τοποθετηθεί το DNA. Το μέγεθος των εμβαθύνσεων αποτυπώνει τις διαστάσεις των δοντιών της κτένας και εξαρτάται από το μέγεθος του δείγματος DNA. Δόντια με διατομή 2x5 mm, σε ένα πήγμα πάχους 0.5 cm και εφόσον απέχουν 1 mm από το δάπεδο του πλαισίου, αφήνουν αποτυπώματα διαστάσεων 2mmx5mmx4mm, τα οποία χωρούν δείγματα όγκου 2x5x4=40 μl. Κτένες με μικρότερα δόντια, διατομής 1mm x 2 mm, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πήγματα πού μπορούν και αυτά να είναι μικρότερου πάχους (3 mm), ώστε να αναλυθούν δείγματα όγκου μέχρι και 4 μl.*

 *Στο στάδιο αυτό, και πριν την μεταφορά της λιωμένης αγαρόζης στο πλαίσιο στερεοποίησης, μπορούμε να προσθέσουμε στην λιωμένη αγαρόζη την χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο ανιχνεύει το DNA μετά την ηλεκτροφόρεση. Προστίθενται 5 μl 10 μg / μl χρωστικής ανά 100 ml τηγμένης αγαρόζης (τελική συγκέντρωση 0.5% w/v). Το διάλυμα 10 μg / μl του βρωμιούχου αιθιδίου παρασκευάζεται σε νερό.*

3. Το πήγμα αγαρόζης τοποθετείται μαζί με το πλαίσιο στην συσκευή ηλεκτροφόρεσης και καλύπτεται με διάλυμα ηλεκτροφόρεσης κατά 1-3 mm.

 *H συσκευή ηλεκτροφόρεσης περιέχει στο μέσον μία εξέδρα επί της οποίας επικάθεται το πλαίσιο με την αγαρόζη. Δύο αντίθετες πλευρές του πλαισίου επικοινωνούν με δύο δεξαμενές, οι οποίες επίσης γεμίζουν με διάλυμα ηλεκτροφόρεσης μέχρις ότου σκεπασθεί η αγαρόζη κατά 1-3 mm.*

4. Στο δείγμα του DNA προστίθεται και αναμιγνύεται 1/5 του όγκου διάλυμα επιφόρτωσης, αποτελούμενο από 30-50% v/v γλυκερόλη ή σουκρόζη ή 20-30% w/v φυκκόλη 400, 0.1-0.2 % κυανούν βρωμοφαινόλης. Κατόπιν το δείγμα μεταφέρεται σε μία εμβάθυνση του πήγματος με την βοήθεια μιας μικροπιπέτας.

 *Η γλυκερόλη, σουκρόζη, ή φυκκόλη χρησιμεύουν στο να καθιστούν το δείγμα του DNA βαρύτερο του διαλύματος ηλεκτροφόρεσης, ώστε να επικάθηται εντός της εμβαθύνσεως του πήγματος χωρίς να εξέρχεται αυτού. Το κυανούν βρωμοφαινόλης είναι μία χρωστική κυανού χρώματος, η οποία κατά την ηλεκτροφόρεση κινείται μπροστά από τα τεμάχια DNA, ώστε να σταματήσουμε την ηλεκτροφόρεση όταν η χρωστική φθάσει στο άλλο άκρο του πήγματος, και να μην χάσουμε κάποιο από τα τεμάχια DNA. Εξαρτωμένου από την συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήγμα, τεμάχια DNA μεγέθους 200-50 ζευγών βάσεων κινούνται μαζί με το κυανούν της βρωμοφαινόλης. Τα ακόμη μικρότερα τεμάχια προηγούνται αυτής. Για ικανοποιητικό διαχωρισμό των DNA, το ποσό πού επιφορτώνεται στην εμβάθυνση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μg DNA ανά εμβάθυνση διαστάσεων 2 mm x 5 mm x 4 mm.*

 *Εάν θέλουμε να διαχωρίσουμε μεταξύ των τα δύο απλά νήματα ενός DNA, τα οποία μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ως προς το μήκος, πριν την μεταφορά του δείγματος στο πήγμα, πρέπει να διαχωρισθούν οι δύο αλυσίδες του DNA. Αυτό επιτυγχάνεται, εάν μετά την προσθήκη του διαλύματος επιφόρτωσης προστεθεί στο δείγμα και 1/10 του όγκου 1-3Μ NaOH, ώστε η τελική συγκέντρωση του NaOH να γίνει 100-300 mM. To DNA επαφίεται να αποφυσιωθεί επί 30’ σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν μεταφέρεται στο πήγμα.*

 *Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτροφόρεσης αποτελούμενο από 36 mM Tris, 36 mM NaH2PO4 , 1 mM EDTA. Εναλλακτικά, και για να αποφευχθεί η επανασύνδεση των δύο αλυσίδων του DNA κατά την ηλεκτροφόρεσή των εντός της αγαρόζης, για την ηλεκτροφόρεση μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλκαλικό διάλυμα αποτελούμενο από 30 mM NaOH, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA. Επειδή η αγαρόζη δεν στερεοποιείται σε τέτοια αλκαλικά διαλύματα, το πήγμα κατασκευάζεται πρώτα με νερό και κατόπιν βυθίζεται για 30΄ σε διάλυμα ηλεκτροφόρεσης. Επειδή το κυανούν βρωμοφαινόλης εξέρχεται του πήγματος κατά την ηλεκτροφόρεση σε τέτοια αλκαλικά πήγματα, το πήγμα καλύπτεται κατά την ηλεκτροφόρεση με μία γυάλινη πλάκα.*

5. Εφαρμόζεται τάση στα ηλεκτρόδια της συσκευής ηλεκτροφόρεσης.

 *Ο αρνητικός πόλος πρέπει να είναι από τη πλευρά πού βρίσκεται το DNA. To DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και κινείται προς την άνοδο. Το κυανούν βρωμοφαινόλης είναι επίσης αρνητικά φορτισμένο και κινείται επίσης προς την άνοδο αλλά έμπροσθεν των τεμαχίων του DNA. Εάν το πήγμα περιέχει και βρωμιούχο αιθίδιο, αυτό κινείται αντιθέτως, προς την κάθοδο με την ίδια περίπου ταχύτητα όπως και το κυανούν βρωμοφαινόλης. Τα τεμάχια του DNA συναντούν κατά την κίνησή των το βρωμιούχο αιθίδιο και προσδένουν αρκετά μόρια της χρωστικής αυτής ώστε να είναι ορατά υπό υπεριώδες φώς μετά το τέλος της ηλεκτροφόρεσης. Η τάση πού εφαρμόζεται είναι συνήθως 5-6 V/cm μήκους του πήγματος. Για ταχεία ανάλυση, μέχρι και 10 V/cm μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Για διαχωρισμό των δύο νημάτων ενός μορίου DNA χρησιμοποιείται αργή κίνηση των νημάτων σε τάσεις 1-1.5 V/cm. Το ssDNA κινείται ταχύτερα από dsDNA του ιδίου μήκους. Μικρά ποσά dsDNA σχηματίζονται κατά την ηλεκτροφόρεση διαχωρισμού νημάτων ssDNA, με επανυβριδισμό των συμπληρωματικών νημάτων. Ηλεκτροφόρεση σε πήγματα με συγκέντρωση αγαρόζης μικροτέρα του 0.5% w/v πρέπει να διεξάγεται σε περιβάλλον 4οC, ώστε να αποφευχθεί η μαλάκυνση του πήγματος λόγω της αναπτυσσόμενης κατά την ηλεκτροφόρεση θερμοκρασίας και ο συνεπαγόμενος μη ικανοποιητικός διαχωρισμός των DNA.*

6. Πριν το κυανούν βρωμοφαινόλης εξέλθει του πήγματος, διακόπτεται η τάση. Εάν χρησιμοποιήθηκε αλκαλικό πήγμα, αυτή ουδετεροποιείται με εμβάπτιση επί 1 h σε 1 Μ Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.6. Εάν το πήγμα δεν περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, τότε εμβαπτίζεται επί 30΄-1 h σε διάλυμα ηλεκτροφόρεσης περιέχον και 0.1% w/v βρωμιούχο αιθίδιο.

7. Το πήγμα μεταφέρεται επί κιβωτίου υπεριωδών (UV) ακτίνων 320-260 nm. Τα διαχωρισθέντα τεμάχια DNA γίνονται ορατά σαν κόκκινες φθορίζουσες ζώνες.

 *Ο φθορισμός οφείλεται στο προσδεδεμένο στο DNA βρωμιούχο αιθίδιο. Μη προσδεδεμένο βρωμιούχο αιθίδιο φθορίζει πολύ ασθενικά, προσδίδοντας στο πήγμα ένα ελαφρό ερυθρό υπόβαθρο. Εάν το ποσό του DNA σε μία ζώνη είναι μικρό, είναι τότε δυνατόν να αποκρύπτεται από το ελαφρό υπόβαθρο φθορισμού. Στην περίπτωση αυτή η ανίχνευση βελτιώνεται μετά από εμβάπτιση του πήγματος επί 1 h σε διάλυμα ηλεκτροφόρεσης χωρίς βρωμιούχο αιθίδιο, ώστε να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο ποσό της μη προσδεδεμένης φθορίζουσας χρωστικής. Το κατώτατο όριο ανιχνεύσιμου ποσού DNA είναι περί τα 10 ng επί επιφανείας 2 mm x5 mm.*

8 Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται με φωτογράφηση του πήγματος υπό υπεριώδες φώς. Χρησιμοποιούνται συνήθως φιλμ Polaroid τύπου 57 ή 667 (ASA 3000) σε άνοιγμα f=4.5 και χρόνο έκθεσης 1/30-1/4 sec. Με χρήση ερυθρού φίλτρου 590 nm και χρόνο έκθεσης 2-3 sec ανιχνεύονται και μικρότερα ποσά DNA, έως και 1 ng. Τεμάχια DNA μεγέθους μικροτέρου του 0.3 kbp δεν μπορούν να διαχωρισθούν με ηλεκτροφόρεση σε πήγματα αγαρόζης αλλά απαιτούνται πήγματα ακρυλαμίδης.

αγαρόζη (% w/v) φάσμα μεγεθών διαχωριζομένων

 μορίων νουκλεϊνικών οξέων (kbp).

 0.3 60-5

 0.6 20-1

 0.7 10-0.8

 0.9 7-0.5

 1.2 6-0.4

 1.5 4-0.2

 2.0 3-0.1

 Διάλυμα τελική συγκέντρωση

 ηλεκτροφόρεσης σύσταση (1X)

 50X TAE Tris: 242 g 40 mM Tris-οξικό οξύ

 οξικό οξύ: 57.1 ml 1 mM EDTA

 500 mM EDTA pH 8: 100 ml pH 8.0

 10Χ ΤΒΕ Tris: 108 g 89 mM Tris,

 βορικό οξύ: 55 ml 89 mM βορικό οξύ

 500 mM EDTA pH 8: 40 ml 2 mM EDTA

 pH 8.0

 10Χ TPE Tris: 108 g 89 mM Tris-φωσφορικό οξύ

 85% φωσφορικό οξύ: 55 ml 2 mM EDTA

 500 mM EDTA pH 8: 40 ml pH 8.0

#### Διαχωρισμός μορίων RNA.

Λόγω του μικροτέρου μεγέθους των, τα μόρια RNA απαιτούν για τον διαχωρισμό τους ένα δίκτυο αγαρόζης με πόρους μικροτέρου μεγέθους από ότι αυτά του διαχωρισμού τεμαχίων DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης της αγαρόζης στο πήγμα σε τιμές 1.5-2% w/v. Τεμάχια RNA μεγέθους μικροτέρου του 0.3 kb δεν μπορούν να διαχωρισθούν με ηλεκτροφόρεση σε πήγματα αγαρόζης αλλά απαιτούνται πήγματα ακρυλαμίδης.

Τα μόρια RNA, αν και είναι στην μεγάλη πλειονότητά των απλής αλυσίδας, κατά την μεγαλύτερη έκταση του μορίου είναι δομής διπλής αλυσίδας, λόγω ενδομητριακών υβριδισμών μεταξύ εκτεταμένων συμπληρωματικών περιοχών του μορίου. Για τον διαχωρισμό επομένως των διαφόρων RNA ανάλογα με το μέγεθος των μορίων, απαιτείται η αποφυσίωσή των με αποϋβριδισμό των περιοχών διπλής αλυσίδας. Αυτό επιτυγχάνεται κατ΄αρχάς με θέρμανση και γλήγορη ψύξη του δείγματος πριν την ηλεκτροφόρεση παρουσία φορμαλδεϋδης. Η φορμαλδεϋδη περιέχεται επίσης και εντός του πήγματος, ώστε να παρεμποδισθεί ο επανυβριδισμός των περιοχών αυτών κατά την ηλεκτροφόρεση. Το βρωμιούχο αιθίδιο δεν μπορεί να είναι παρόν στα πήγματα κατά την ηλεκτροφόρεση διότι αντιδρά με την γλυοξάλη ή φορμαλδεϋδη. Η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο γίνεται στην περίπτωση αυτή μετά την ηλεκτροφόρεση με εμβάπτιση του πήγματος σε διάλυμα περιέχον την χρωστική, όπως περιγράφεται και για τα πήγματα διαχωρισμού DNA, αφού όμως πρώτα απομακρυνθεί η φορμαλδεϋδη με εμβάπτιση σε διάλυμα ηλεκτροφόρεσης.

Τέλος, τα RNA αποσυντίθενται σε pH>8 και επομένως τα χρησιμοποιούμενα διαλύματα ηλεκτροφόρεσης είναι συνήθως 50 mM ΜΟPS-NaOH pH = 7, εάν χρησιμοποιούνται πήγματα φορμαλδεΰδης ή 10 mM NaH2PO4-φωσφορικό οξύ pH = 7 εάν η αποφυσίωση των RNA έγινε με **γλυοξάλη**.

1. Αναμιγνύεται η αγαρόζη με νερό 3/4 του τελικού όγκου του πήγματος και τήκονται σε φούρνο μικροκυμάτων ή σε θερμαινόμενη πλάκα, όπως περιγράφεται για την κατασκευή πηγμάτων για διαχωρισμό DNA.

2. Προστίθεται 1/10 του τελικού όγκου συγκεντρωμένο (10X) διάλυμα ηλεκτροφόρεσης. Για πήγματα περιέχοντα και φορμαλδεϋδη, χρησιμοποιείται MOPS. Για πήγματα χωρίς φορμαλδεϋδη χρησιμοποιείται φωσφορικό διάλυμα.

3. Το τήγμα επαφίεται να ψηχθεί περί τους 60οC. Για πήγματα περιέχοντα και φορμαλδεϋδη, προστίθεται τώρα 37% v/v φορμαλδεϋδη (12.3 M), 1 ml / 4.6 ml τελικού όγκου πήγματος, ώστε η τελική συγκέντρωση της φορμαλδεϋδης να είναι 6.5 % v/v (2.2 M). O υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με νερό. Εάν πρόκειται για πήγματα χωρίς φορμαλδεΰδη, απλώς ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με νερό.

 *Η φορμαλδεϋδη πρέπει να έχει pH>4. Ειδ΄άλλως είναι οξειδωμένη. Τα παράγωγα οξειδωμένης φορμαλδεϋδης διασπούν τα RNA. To 10X MOPS διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι. Κιτρινίζει με τον καιρό, αλλά μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί.*

4. Το υγρό ακόμη διάλυμα αγαρόζης αποχύνεται και στερεοποιείται στο πλαίσιο στερεοποίησης παρουσία της οδοντωτής κτένας για δημιουργία εμβαθύνσεων, όπως περιγράφεται για την κατασκευή πηγμάτων αγαρόζης για διαχωρισμό DNA.

5. Εάν πρόκειται για πήγματα με φορμαλδεϋδη, τα RNA αποφυσιώνονται με θέρμανση παρουσία φορμαλδεϋδης και φορμαμίδης. Έως και 20 μg RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μία εμβάθυνση διαστάσεων 2mm x 5mm x 4mm. Η αποφυσίωση στην περίπτωση αυτή εκτελείται ως εξής:

Αναμιγνύονται:

RNA: 11.25 μl (μέχρι 20 μg)

10X MOPS: 5 μl

37% v/v φορμαλδεϋδη: 8.75 μl (τελική συγκέντρωση 2.2 Μ)

φορμαμίδη: 25 μl

 τελικός όγκος: 50 μl

 To ανωτέρω μίγμα θερμαίνεται στους 55οC επί 15΄, και ψήχεται γρήγορα σε πάγο.

Εάν πρόκειται για πήγματα μη περιέχοντα φορμαλδεϋδη, η αποφυσίωση εκτελείται με προσθήκη γλυοξάλης και DMSO, ως εξής:

Αναμιγνύονται:

RNA: 10 μl (μέχρι 20 μg)

10Χ φωσφορικό διάλυμα: 5 μl

DMSO: 28.4 μl

6M γλυοξάλη: 6.6 μl

 τελικός όγκος: 50 μl

To ανωτέρω μίγμα θερμαίνεται στους 50οC επί 1 h, και ψύχεται γρήγορα σε πάγο.

 *Η γλυοξάλη και η φορμαμίδη πρέπει να έχουν pH=7. Εάν το pH<7 εκτελείται εκχύλιση με ρητίνη BioRad AG 501-X8 (ανάμικτη, κατιόντων και ανιόντων) μέχρι το pH να γίνει περίπου 7. Η φορμαμίδη μπορεί κατόπιν να κρυσταλλωθεί στους 0οC και να φυλαχθεί στους -20οC σε μικρούς όγκους των 0.5-1 ml. Με την ίδια ρητίνη εκχυλίζεται και η φορμαλδεϋδη εάν το pH της είναι μικρότερο του 4.*

6. Στο δείγμα του αποφυσιωμένου RNA προστίθεται 1/10 του όγκου (5μl) διάλυμα επιφόρτισης αποτελούμενο από 50% v/v γλυκερόλη, 0.2% w/v κυανούν βρωμοφαινόλης και μεταφέρεται σε μία από τις εμβαθύνσεις του πήγματος με την βοήθεια μίας μικροπιπέτας.

7. Εκτελείται ηλεκτροφόρεση με 1X MOPS ή 1Χ φωσφορικό διάλυμα, αναλόγως του τύπου του πήγματος και της μεθόδου αποφυσιώσεως του RNA. To MOPS χρησιμοποιείται όταν έχει χρησιμοποιηθεί φορμαλδεϋδη και το φωσφορικό διάλυμα όταν έχει χρησιμοποιηθεί γλυοξάλη. Η τάση είναι 4-6 v/cm μήκους του πήγματος.

 *Υπάρχουν αρκετά RNA πού κινούνται ταχύτερα της χρωστικής κυανούν της βρωμοφαινόλης. Η ηλεκτροφόρεση επομένως, πρέπει να σταματήσει όταν η χρωστική διανύσει τα 3/4 του μήκους του πήγματος. Εάν χρησιμοποιηθεί φωσφορικό διάλυμα ηλεκτροφόρεσης, το pH του ανέρχεται κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρεσης σε τιμές μεγαλύτερες του 8. Υπό τις αλκαλικές αυτές συνθήκες, η γλυοξάλη αποσυνδέεται από το RNA. Για να αποφευχθεί αυτό, το διάλυμα πρέπει να αντικαθίσταται από νέο κάθε 30΄ ή να αναμιγνύεται συνεχώς με μία αντλία επανακυκλοφόρησης. Η φορμαλδεϋδη διαχέεται εκτός του πήγματος κατά την ηλεκτροφόρεση. Εάν είναι απαραίτητο να διεξαχθεί μακράς διαρκείας ηλεκτροφόρεση σε πήγματα περιέχοντα φορμαλδεϋδη, για παράδειγμα μία ολονύκτια ηλεκτροφόρεση, τότε η συγκέντρωση της φορμαλδεϋδης στο πήγμα πρέπει να αυξηθεί κατά το δεκαπλάσιο.*

8. Η φορμαλδεϋδη ή η γλυοξάλη απομακρύνονται μετά το πέρας της ηλεκτροφόρεσης με εμβάπτιση και ανακίνηση του πήγματος επί 1 h σε νερό ή 100 mM οξικό αμμώνιο. Κατόπιν το πήγμα εμβαπτίζεται και πάλι με ανακίνηση επί 1 h σε 100 mM οξικό αμμώνιο, 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, ή νερό περιέχοντα 0.5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο, και εκπλύνεται επί 1 h στο ίδιο διάλυμα χωρίς βρωμιούχο αιθίδιο.

9. Οι ζώνες των RNA είναι ορατές υπό υπεριώδες φώς λόγω του ερυθρού φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου του προσδεδεμένου στα RNA. To πήγμα φωτογραφίζεται υπό υπεριώδες φώς. Χρησιμοποιούνται συνήθως φιλμ Polaroid τύπου 57 ή 667 (ASA 3000) σε άνοιγμα f=4.5 και χρόνο έκθεσης 1/30sec-3sec.

 *Ta mRNA δεν είναι ορατά διότι ευρίσκονται κατεσπαρμένα σαν ζώνες πολύ μικρού ποσού RNA καθ΄όλη την έκταση του πήγματος από την περιοχή μεγεθών 20 kb και κάτω. Τα rRNA είναι ορατά σαν δύο έντονες ζώνες. Επιπλέον ζώνες μιτοχονδριακού ή χλωροπλαστικού rRNA είναι συχνά επίσης ορατές σε μικρότερα ποσά και δυνατόν να συμπίπτουν μερικώς και να μην διαχωρίζονται επαρκώς από το κυτοπλασμικά rRNA. Τα μιτοχονδριακά και χλωροπλαστικά rRNA διασπώνται συνήθως σε μικρότερα τμήματα και εμφανίζονται στο πήγμα σαν ένα σύνολο τεσσάρων ζωνών. Η διάσπαση αυτή μπορεί να αποφευχθεί εάν κατά την απομόνωση των RNA και τον διαχωρισμό των με ηλεκτροφόρεση, περιληφθεί στα διαλύματα και μαγνήσιο σε συγκέντρωση 10 mM. Tα tRNA δεν διαχωρίζονται το ένα από το άλλο, αλλά κινούνται μπροστά σαν μία σχετικά διάχυτη ζώνη.*