

Téma: GELOVÁ ELEKTROFORÉZA NUKLEOVÝCH KYSELIN V AGARÓZOVÉM GELU

Princip:

Elektroforéza využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost elektroforézy závisí na: velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a na koncentraci v roztoku. **Molekuly nukleových kyselin** nesou v zásaditém prostředí **ZÁPORNÝ náboj** (díky přítomnosti fosfátových skupin) a **pohybují se v elektrickém poli směrem k ANODĚ**. Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči – nejčastěji gelu.

Gely (agarózový, polyakrylamidový aj.) tvoří **trojrozměrná síť**, kterou větší molekuly procházejí pomaleji než menší molekuly (malé fragmenty se pohybují rychleji, tzn. doputují na gelu nejdál).

Agarózový gel se připravuje rozpouštěním **agarózy** (= polysacharid) **v pufru, který je také obsažen v elektroforetické vaně jako elektrolyt** (bude použit **TBE pufr** obsahující *Tris*, *kyselinu boritou* a *EDTA*).

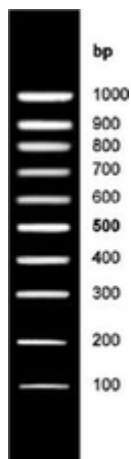
Vzorky (fragментy DNA, PCR produkty) se nanášejí **do jamek v gelu**, které byly vytvořeny pomocí tzv. **hřebínku**. Zatížení DNA (DNA klesne do jamek v gelu) a migrace DNA v gelu jsou zajištěny přidáním tzv. **nanášecího** neboli **vkládacího pufru**, který je tmavě zbarvený a je tak umožněna kontrola vložení PCR produktu do příslušné jamky a také migrace v gelu.

Pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů se do jedné jamky gelu nanáší tzv. **velikostní marker** (hmotnostní standard, DNA **ladder** = žebřík) o definované velikosti jednotlivých fragmentů (např. 100 bp ladder)

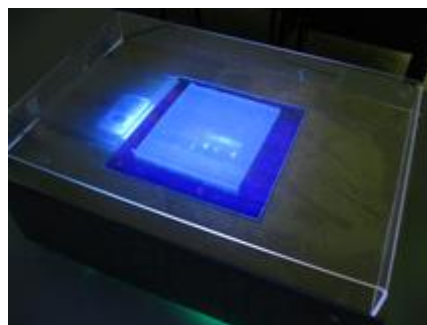
Vizualizace: Do gelu se obvykle přidává **barvivo, které se váže na DNA** (Gel RED aj.), aby byl výsledek elektroforézy (tj. fragmenty DNA) po doběhnutí viditelný pod UV zářením v přístroji zvaném **UV transluminátor**.



elektroforetická vana

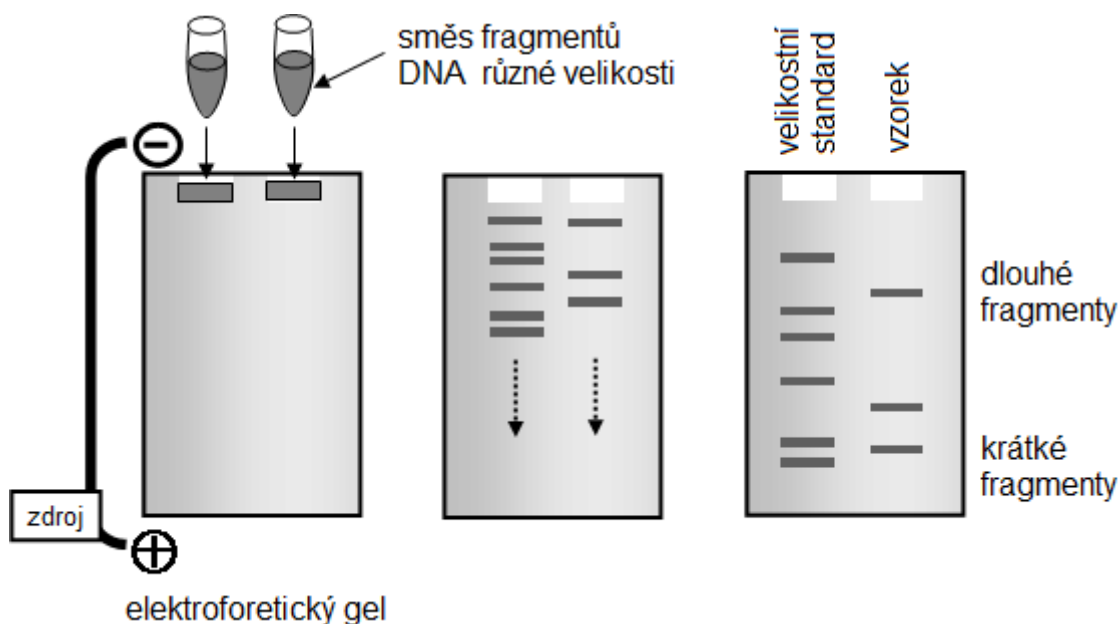


100 bp¹ ladder



vizualizace

¹ bp = z angl. „base pair“, počet komplementárních párů bází ve struktuře nukleových kyselin



Postup:

- **Příprava 1,5 % gelu** z práškové agarózy a TBE pufru:
 - Navážit na předvážkách **1,5 g** agarózy na 100 ml TBE pufru.
 - Pufr + agarózu rozpustit v mikrovlnné troubě (cca 2 až 4 min, kontrolovat v průběhu zahřívání!!).
 - Rozpuštěný gel zchladit pod proudem vody.
 - Ke zchlazenému gelu napipetovat barvivo Gel RED (10 μ l / 100 ml gelu) a jemně ho promíchat špičkou (slouží k následné vizualizaci DNA v UV transluminátoru).
 - Gel nalít do elektroforetické vany s umístěným hřebínkem a nechat úplně ztuhnout (cca 20 min).
 - Poté vyndat hřebínek a gel správně umístit do elektroforetické vany.
- **Nanášení vzorků:**
 - Napipetovat 5 μ l vzorků do příslušných jamek v gelu vytvořených pomocí tzv. hřebínku.
 - Pro odhad velikosti DNA fragmentů do poslední jamky gelu nanést 5 μ l tzv. **velikostního markeru (ladderu)**.
 - Připojit elektroforetickou vanu ke zdroji a spustit elektroforézu při konstantním napětí (poběží cca 45 min při napětí 100 V).
 - Přemístit gel na UV-transluminátor a zkontrolovat výsledek pod UV zářením (Při delším zapnutí UV lampy dojde k vysvícení gelu, tj. kontrola jen rychlá, orientační!).
 - Zhotovit fotografii při prosvícení gelu UV lampou.