

Název: Praktický kurz zpracování získaných
fluorescenčních dat v gelové elektroforéze

Školitel: Ing. Soňa Křížková, Ph.D., Mgr. Michal Horák,
RNDr. Josef Růžička, Bc. Miroslav Matoušek, Ing.
Iva Blažková

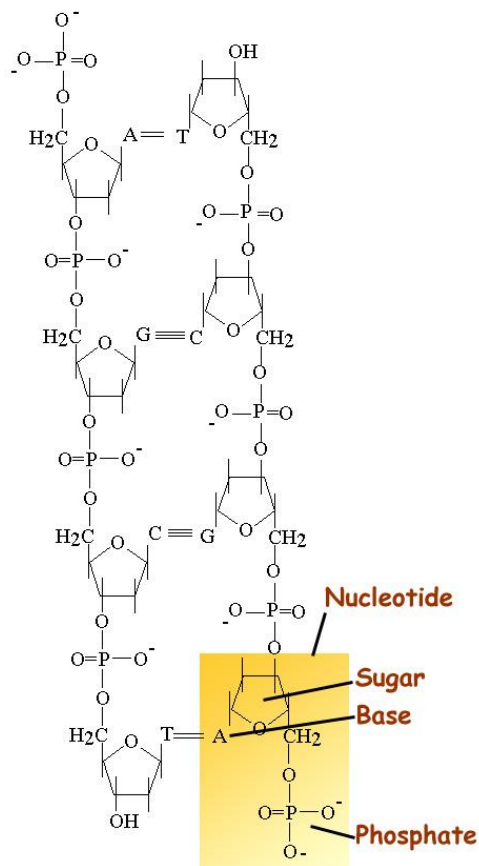
Datum: 19. 7. 2013

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



Nukleové kyseliny (DNA a RNA) mají díky své primární struktuře elektrický náboj. Záporný náboj pochází od zbytků kyseliny fosforečné (jak je zřejmé z obrázku) a v primárním řetězci jsou v molekule DNA přítomny dusíkové báze a cukr. Na základě těchto skutečností DNA fragmenty migrují v elektrickém poli směrem k anodě různou rychlostí v závislosti na své velikosti (délce). Nejmenší fragmenty putují nejrychleji, proto se po skončení elektroforézy nacházejí nejdále od místa nanesení vzorku. Velikosti fragmentů DNA lze určit srovnáním se standardem (směs fragmentů DNA o různých definovaných délkách). Jako standard velikostí DNA fragmentů se často používá genomová DNA bakteriofága λ rozštěpená restrikcí enzymem na fragmenty o známé délce.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



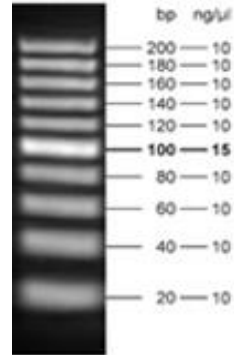
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

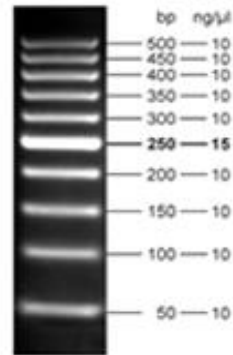
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

20 bp DNA Ladder



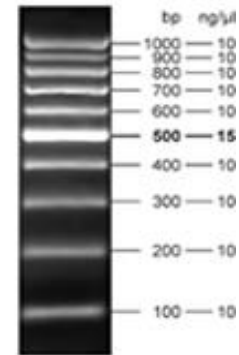
3.8% Agarose

50 bp DNA Ladder



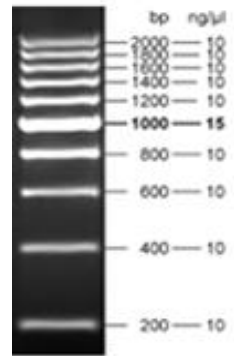
3.0% Agarose

100 bp DNA Ladder



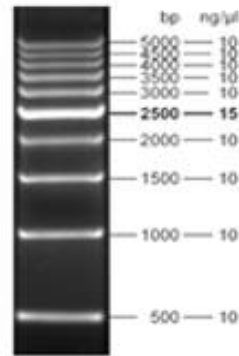
2.4% Agarose

200 bp DNA Ladder



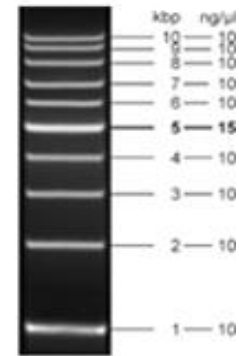
1.8% Agarose

500 bp DNA Ladder



1.2% Agarose

1 kbp DNA Ladder



0.6% Agarose



50 × TAE pufr (242 g Trizma báze, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8, doplnit vodou na 1l)
Agarosa (high-melting pro běžné použití, v případě následné izolace DNA z gelu použijeme low-melting agarosu)
DNA ladder (např. λ /Hind III DNA, 2-log DNA ladder, 100 bp DNA ladder)
GLS (nanášecí pufr, 50% glycerol, 0.01% bromfenolová modř)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

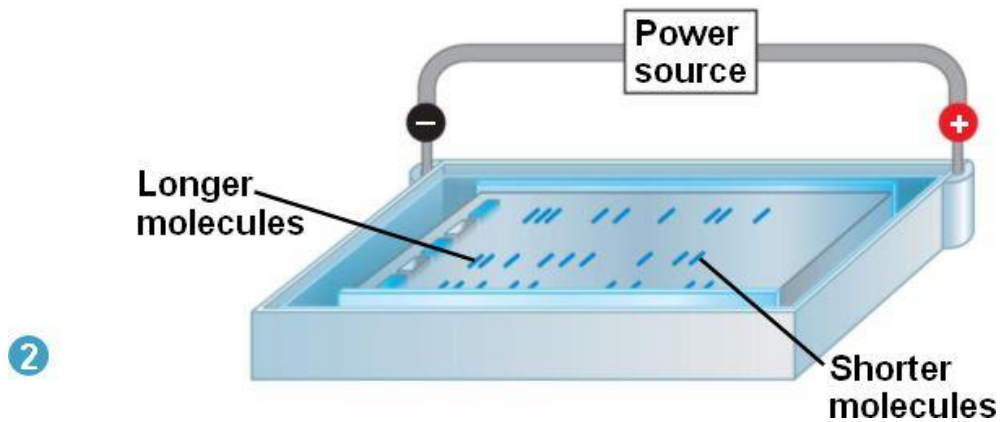
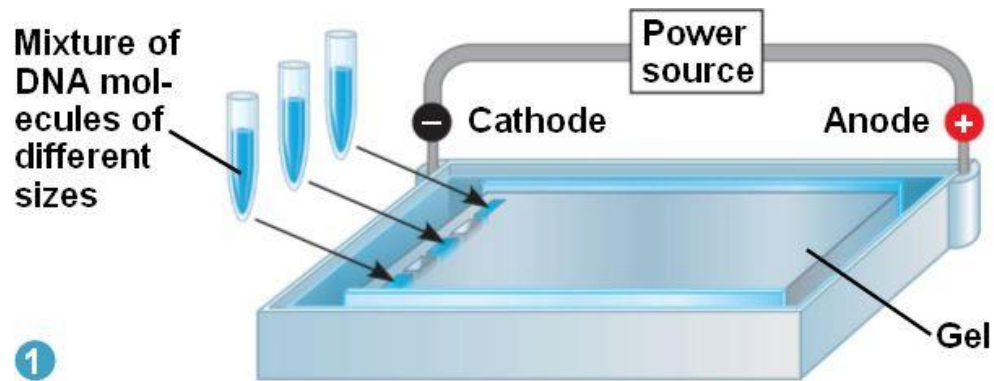


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdelávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

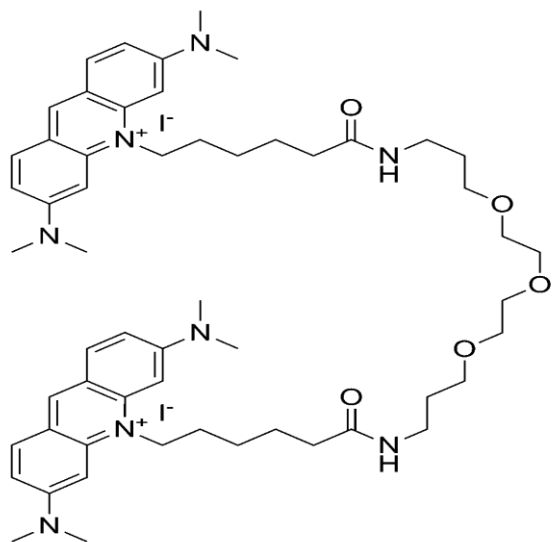
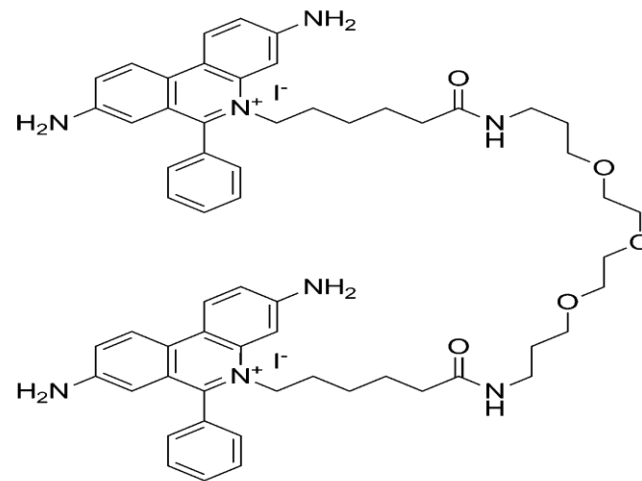
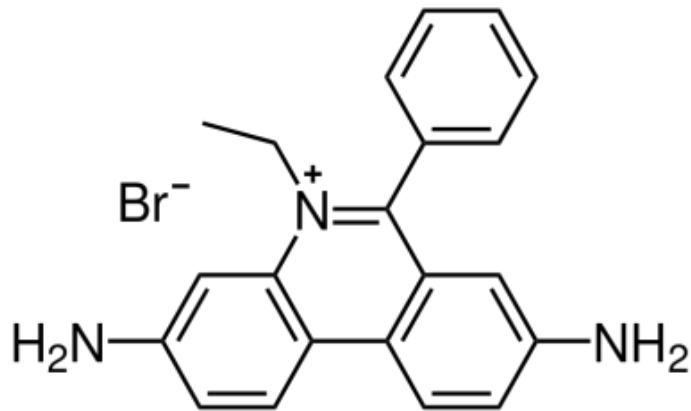


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Pro detekci DNA fragmentů v podobě červených, resp. zelených proužků lze použít buď UV-transluminátor nebo fluorescenční imager. Ve srovnání s ethidium-bromidem jsou tato barviva schopna se vázat efektivněji do struktury ssDNA nebo RNA. Pokud tedy pracujeme s RNA nebo ssDNA, přednostně použijeme tato barviva. Jejich další výhody jsou vyšší citlivost, možnost excitace viditelným zářením a vyšší kvalita snímků pořízená fluorescenčním imagerem.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

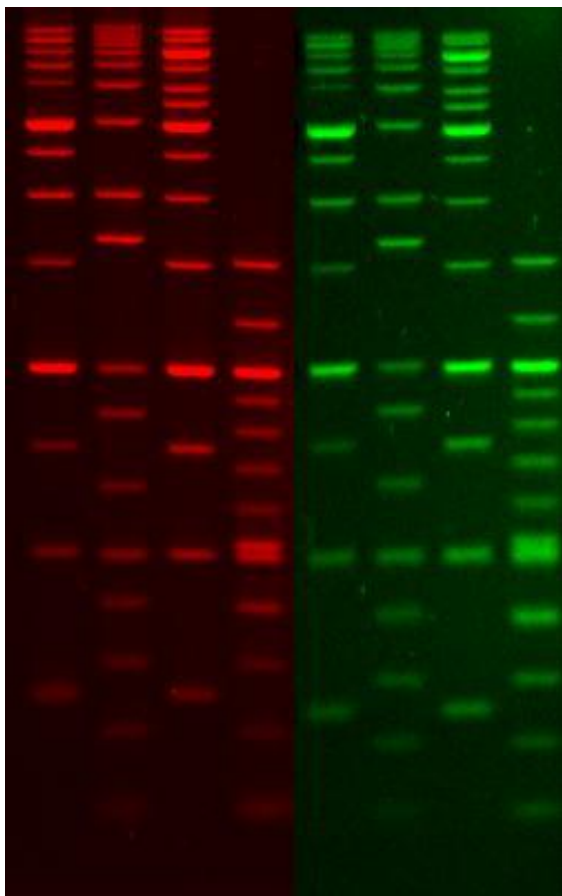


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

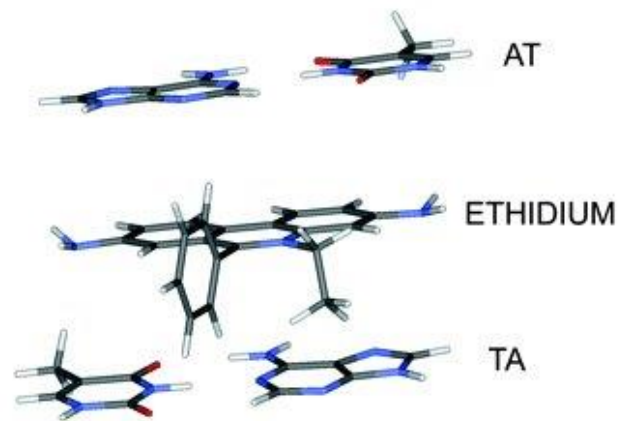


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Pokud sledujeme malé změny mobility bandů nebo používáme DNA pro další práci (klonování, re-amplifikace, atd.), je vhodné použít následné barvení gelu: elektroforézu provedeme na gelu bez přídavku fluorescenčního barviva. Po proběhnutí elektroforézy gel inkubujeme 30 min buď v 50 ml TAE pufru s přídavkem 5 μ l ethidium-bromidu nebo v 50 ml 0.1 M NaCl s přídavkem 15 μ l barviva GelRed™ nebo GelGreen™. V případě potřeby zachovat biologickou funkci DNA (klonování) je vhodné nanést na gel dva vzorky vedle sebe, po proběhnutí elektroforézy gel rozdělít, jednu polovinu nabarvit a z druhé poloviny provést excizi bandu.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

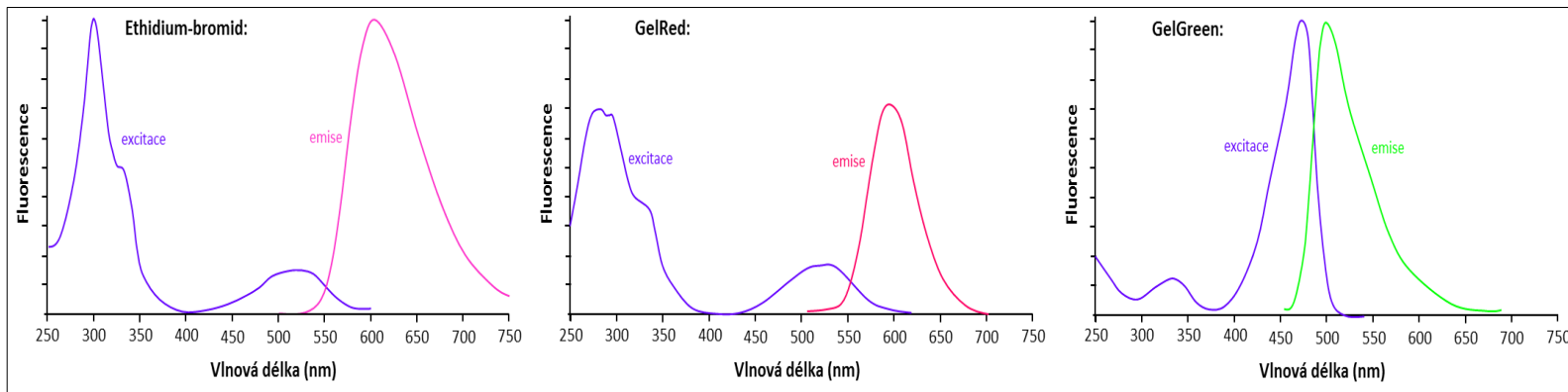


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Srovnáním intenzit proužků (bandů) vyizolované DNA a bandů DNA jednotlivých délek odhadneme koncentraci DNA. **Jsou k tomu zapotřebí informace z příbalového letáku DNA standardu.**



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

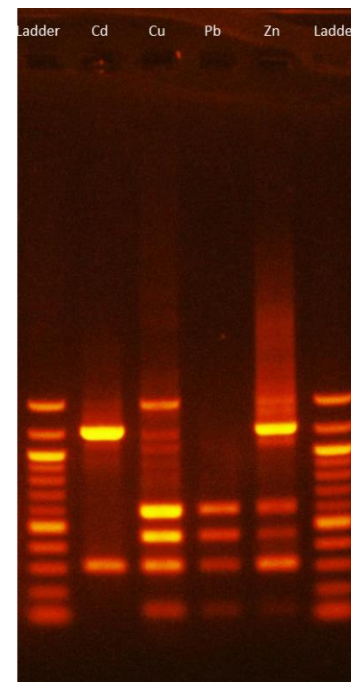
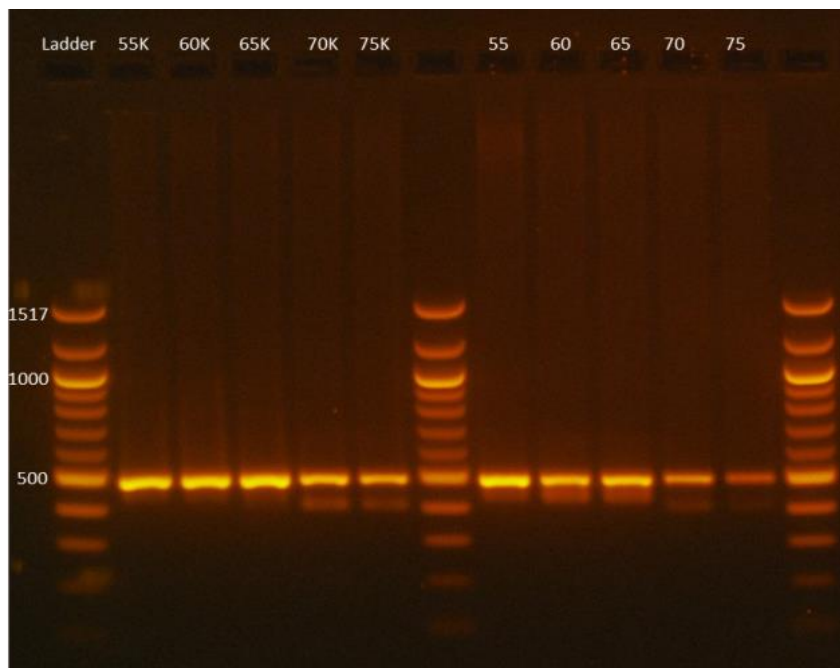


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Součástí protokolu je popsaná fotografie gelu, kde jsou označeny jednotlivé dráhy vzorků a proužky (bandy) náležející DNA nebo RNA. Uvedeme rovněž koncentraci DNA, pokud ji bylo možné odhadnout.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



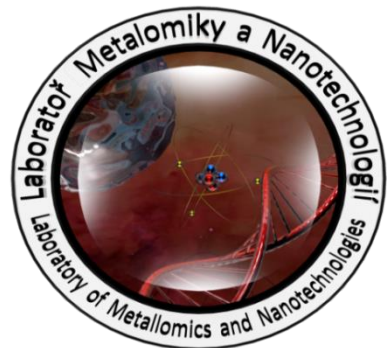
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Děkuji za pozornost!



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Mendel
University
in Brno

