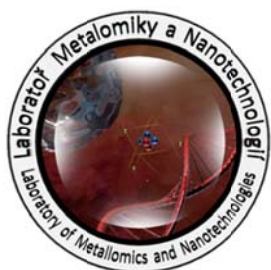


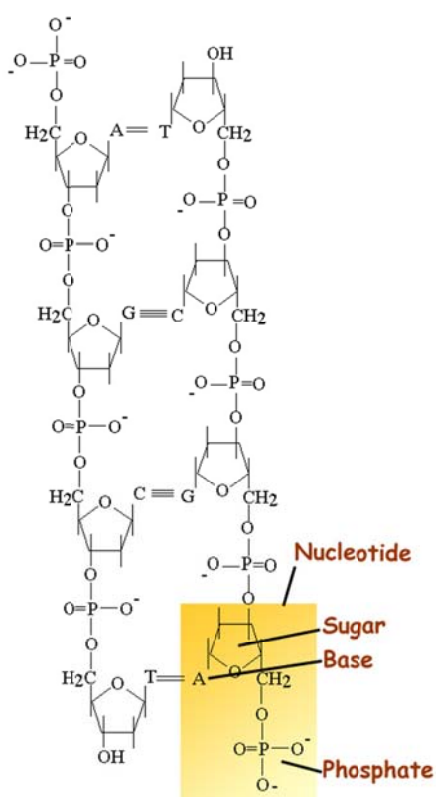
Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií

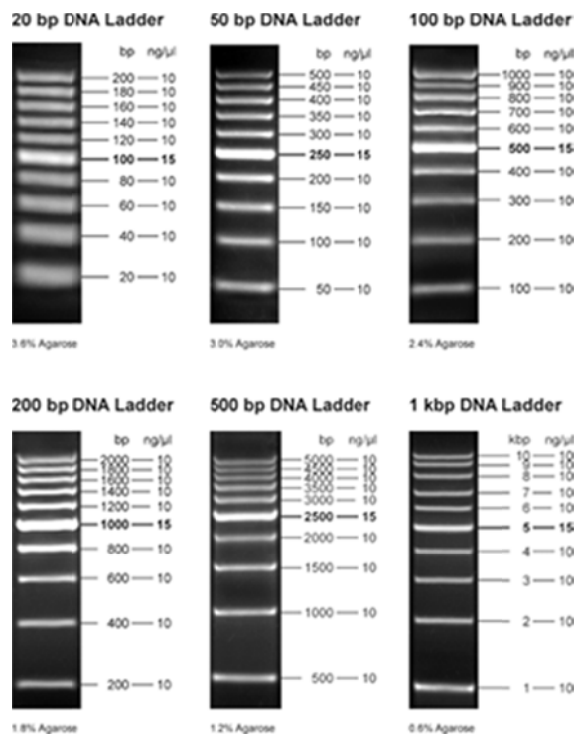


AGAROSOVÁ ELEKTROFORÉZA

Anotace

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.





Použité chemikálie

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)





Koncentraci gelu zvolíme dle následující tabulky na základě předpokládané délky separovaných fragmentů nukleových kyselin

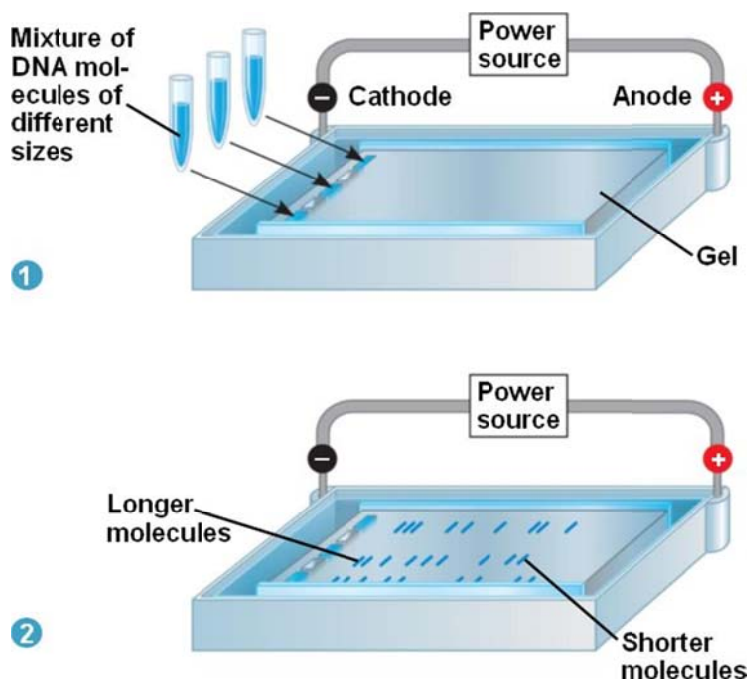
Koncentrace agarosy (%)	Délka fragmentů (kb)
0.3	5-25
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2	0.1-2

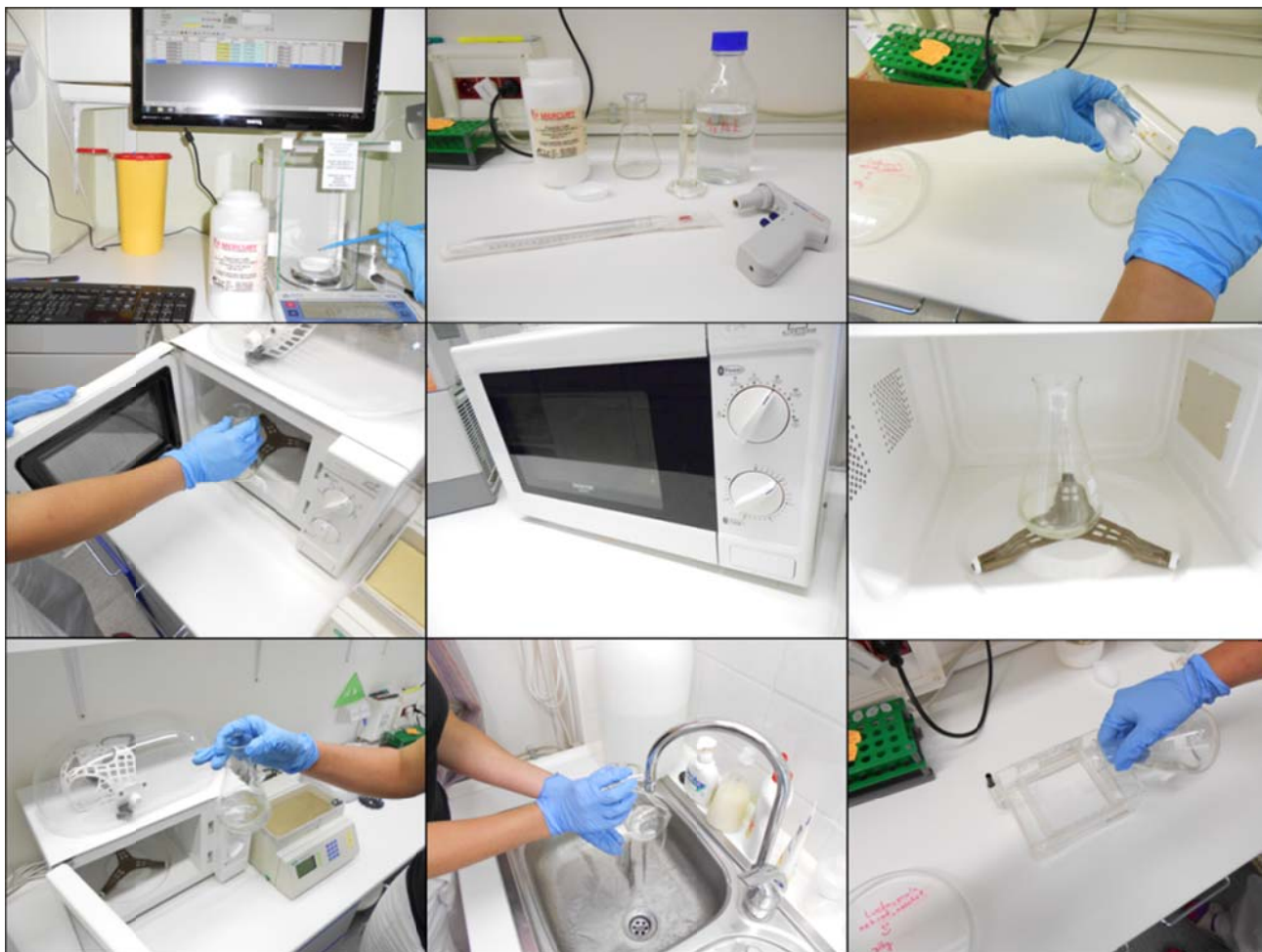
Tab. 1: Výběr vhodné koncentrace gelu podle předpokládané délky fragmentů DNA.

Pracovní postup

- Zkompletujeme vaničku na nalévání gelu
- Připravíme 50 ml agarosového gelu smícháním agarosy a 1 × TAE pufru v Erlenmeyerově baňce.
- Zahříváme v mikrovlnné troubě po dobu cca 1 min. Jakmile roztok zprůhlední **a ještě než začne probíhat var**, vyjmeme baňku z trouby a ochladíme pod proudem vody na teplotu cca 55°C (lze udržet v ruce v rukavicích).
- Přidáme 5 µl roztoku fluorescenčního barviva ethidium-bromidu, zamícháme zakroužením a naléváme do připravené vaničky a ihned vložíme hřeben pro vytvoření nanášecích jamek.
- Po ztuhnutí (cca 30 min) odstraníme zaslepení vaničky a gel vložíme do aparatury, poté opatrně oběma rukama vyndáme hřeben.
- Doplníme tolik 1 × TAE pufru, aby gel byl pod jeho hladinou a elektrolytem mohl procházet elektrický proud.
- Na kousek parafilmu (cca 2 cm) nanese cca 2 µl kapky GLS podle počtu vzorků. Smíchání vzorek s nanášecím pufrům provedeme tak, že 5 µl vzorku nasajeme do mikropipety a vypustíme do kapičky GLS. Opakovaným nasáváním a vypouštěním pipety směs promícháme (cca 3×) a poté stiskneme píst pipety nadoraz a nasajeme celou kapičku a pomalu ji vstříkneme do jamky.

- h) Poté, co jsme nanесли na gel všechny vzorky, nanese 2 μl DNA standardu.
- i) Uzavřeme aparaturu a zapojíme ji tak, aby červený banánek byl zapojený do červeně označeného výstupu zdroje a černá do černého. Je nutno, aby kladný pól byl připojen k opačnému konci gelu.
- j) Nastavíme napětí 100V, po cca 2 min můžeme zkontrolovat, jestli vzorky opravdu migrují směrem k opačnému konci gelu, jestliže ne, okamžitě změním zapojení aparatury. Necháme elektroforézu probíhat cca 30 min. *Pozn.:* použité napětí a čas elektroforézy se může měnit v závislosti na konkrétní aplikaci.
- k) Pořídíme fotodokumentaci gelu.





1. Navážení pracovního množství agarosu, 2. Příprava potřebných roztoků a chemického skla, 3. Přenesení agarosu do Erlenmeyerovy baňky, 4. Umístění připravené směsi do mikrovlnné trouby, 5. Rozpuštění gelu, 6. Kontrola průběhu rozpouštění agarosu, 7. Pravidelné promíchání, 8. Ochlazení pod tekoucí vodou na teplotu asi 50 °C, 9. Nalítí gelu do elektroforetické vany a vložení hřebenu.

Doporučená literatura

Green M. R., Sambrook J.: Molecular cloning A laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, ISBN: 978-1-936113-42-2