

ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE V AGAROSOVÉM GELU

Potřeby: zdroj elektrického napětí, elektroforetická vana, vanička, hřebínek, agarosa, elektroforetický pufr TAE nebo TBE, nanášecí pufr, velikostní marker (tzv. ladder).

Příprava gelu a elektroforetické vaničky:

- Množství připravovaného gelu závisí na počtu vzorků a tedy velikosti vaničky a délce hřebínku.

- Koncentrace gelu závisí na typu fragmentů DNA, které chceme separovat, viz. tabulka. Pro většinu aplikací se ale používá 1% agarozového gelu. Takže, např. pro 40 ml 1% agarozového gelu použijeme 40 ml 1X TAE pufru nebo 1X TBE pufru a 0,4 g agarozy.

Koncentrace gelu (%)	Velikost separované DNA (kb)
0,2	5-40
0,4	5-30
0,6	3-10
0,8	1-7
1	0,5-5
1,5	0,3-3
2	0,2-1,5
3	0,1-1

- Agarózu smícháme s pufrem nejlépe ve skleněné lahvi se šroubovacím víčkem, lahev uzavřeme tak, že je víčko částečně povolené nebo roztok můžeme připravit v Erlenmayerově bance, přičemž hrdlo přikryjeme plastovou folií, kterou perforujeme pro snadnější odchod páry. Velikost lahve musí být cca 2x větší než je objem připravovaného gelu.

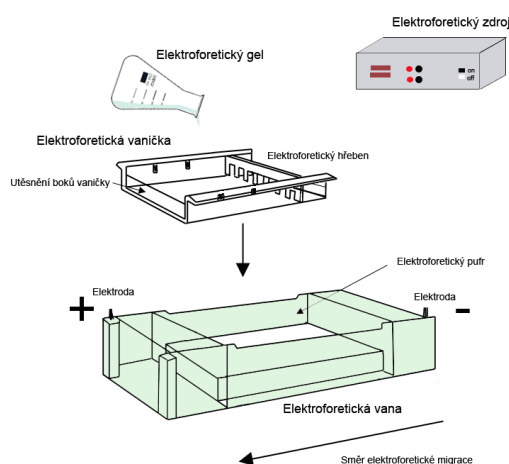
- Agarózu nejnádhěji rozpustíme v mikrovlnné troubě, obvykle stačí 1-1,5 min nebo ji lze rozpustit klasicky na plotýnce. V průběhu rozeřívání můžeme 1-2x roztokem zamíchat. Agaróza musí být dokonale rozpuštěna, tzn., nesmí být patrná žádná zrnka tající agarózy.

- Připravený gel necháme zchladnout tak, aby již nebyl vařící, ale přesto dostatečně horký na to, aby nezačal předčasně tuhnut. Pokud nám gel nedopatřením ztuhne, můžeme ho opětovně rozpustit.

- Připravíme si ELFO vaničku, jejíž čela jsme předtím důkladně oblepili lepicí páskou či izolepou (v některých případech jsou vaničky dodávány s kovovými pásky, kterými vaničku utěsníme, či je dodáván jiný „utěšňovací“ systém). Do vaničky vložíme ELFO hřebek a vlijeme agarozový gel, který poté necháme dokonale ztuhnout. Po ztuhnutí odstraníme z vaničky utěsnění a vyndáme hřebek.

- Vaničku usadíme do elektroforetické vany, a to tak, aby jamky byly u záporného pólu. Gel s vaničkou zalijeme 1x ELFO (1x TAE nebo 1x TBE) roztokem. Hladina ELFO roztoku by měla být těsně (1-2 mm) nad gelem.

SCHÉMA APARATURY PRO AGAROSOVOU ELEKTROFORÉZU



V některých laboratořích se přidává do gelu etidium bromid, který nám v závěrečné fázi umožní vizualizaci DNA či RNA. Nicméně jelikož je etidium bromid mutagen, z bezpečnostního hlediska (kvůli odpařování a kontaminaci laboratorního prostředí) je doporučováno gel barvit až po elektroforéze. Rovněž etidium bromid nepatrně ovlivňuje mobilitu DNA, což v některých případech experimentů není žádoucí.

I

Příprava vzorků a jejich nanášení:

- Ke vzorkům přidáme nanášecí pufr. Množství dodaného pufru se odvíjí od jeho koncentrace. Pokud je koncentrace nanášecího pufru 10x, ke vzorkům přidáme pufru o objemu jedné desetiny finálního objemu roztoku. Vzorky promícháme

TIP

Je výhodné míchat vzorky s nanášecím pufrem na kousku parafilmu místo klasicky ve zkumavce.

- Připravené vzorky nanese do jamek, přičemž díky přítomnosti glycerolu vzorky klesnou na dno jamky. Aby byly jamky lépe zřetelné, pro snadnější nanášení podložíme elektroforetickou vanu tmavým papírem. Pro nanášení používáme 1-20 μ l pipety, které mají obvykle jemnější chod než pipety na větší objemy a nanášení vzorků je s nimi proto snadnější.
- Do jedné z jamek rovněž nanese hmotnostní marker („size marker“ nebo také „ladder“). Objem nanášeného markeru je doporučován výrobcem.

Separace vzorků:

ELFO vanu přikryjeme víkem a zapneme ELFO zdroj. Nastavíme napětí tak, aby bylo 5-8 V/cm mezi elektrodami. Elektroforézu necháme běžet maximálně tak dlouho, až je bromfenolová modř ve 2/3 až 3/4 délky vaničky.

Barvení vzorků (pokud nebyla barvička přidána přímo již do elektroforetického gelu):

- Gel vyjeme z vaničky a ponoříme ho na 10-20 min do vodného roztoku etidium bromidu (20 μ l 1% EtBr ve 100ml H₂O), případně GelRed či SyberGreenu.

Zásobní roztok etidium bromidu bývá 1%, tj. 10 mg/ml. Pracovní roztok skladujeme ve tmě a lze jej využívat opakovaně.

- Během barvení roztokem protřepáváme.
- Po obarvení opatrně gel z barvicího roztoku vyjeme, opláchneme vodou a vizualizujeme pod UV světlem. Pro zvýšení kontrastu, lze po ukončení ELFO nežádoucí pozadí odstranit promýváním gelu ve vodě po dobu cca 10 min.