

## ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

Při přípravě polyakrylamidového gelu lze výběrem vhodné koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu ovlivňovat velikost pórů gelu a tím optimální separaci fragmentů DNA o určité délce. Se zvyšující se koncentrací těchto látek se póry gelu stávají menšími a gel se hodí pro separaci menších molekul, viz. tabulka. Pro PAGE je jako elektroforetický pufr využíván TBE.

PAGE je buď ve formě denaturační s přidavkem denaturační látky, jako např. 0,8M močoviny nebo ve formě nedenaturační, tzv. nativní.

| Akrylamide/Bisakrylamid | Gel % | Nativní DNA/RNA (bp) | Denaturovaná DNA/RNA (bp) |
|-------------------------|-------|----------------------|---------------------------|
| <b>19:1</b>             | 4     | 100-1500             | <b>70-500</b>             |
|                         | 6     | 60-600               | <b>40-400</b>             |
|                         | 8     | 40-500               | <b>20-200</b>             |
|                         | 10    | 30-300               | <b>15-150</b>             |
|                         | 12    | 20-150               | <b>10-100</b>             |
| <b>29:1</b>             | 5     | <b>200-2000</b>      | 70-800                    |
|                         | 6     | <b>80-800</b>        | 50-500                    |
|                         | 8     | <b>60-400</b>        | 30-300                    |
|                         | 10    | <b>50-300</b>        | 20-200                    |
|                         | 12    | <b>40-200</b>        | 15-150                    |
|                         | 20    | <b>&lt;40</b>        | <40                       |

Tabulka. Koncentrace polyakrylamidového gelu pro separaci nukleových kyselin. Doporučené hodnoty pro dané aplikace jsou zvýrazněny tučně.

## Příprava elektroforetické aparatury:

- Saponátem a vodou se důkladně umyjí skla, plastové vložky a hřebínek, poté se důkladně opláchnou deionizovanou/destilovanou vodou a etanolem a nechají se uschnout.

**I** Se skly se manipuluje jen v rukavicích, přičemž se skla drží za jejich okraje. Skla nesmí být jakkoliv znečištěna, aby bylo zabráněno tvorbě bublin při nalévání gelu.

- Skla se sestaví k sobě, vloží boční vložky, okraje skel se mohou olepit izolepou pro ujištění, že nedojte k vytečení roztoku gelu. Skla se zajistí svorkami a vloží se vertikálně do připravené aparatury.

## Příprava roztoku gelu s požadovanou koncentrací (viz. tabulka dole):

- Odměří se požadovaný objem vody
- Pokud se připravuje denaturační gel, přidá se močovina, tak aby její finální koncentrace byla 0,8M. Přičemž se roztok důkladně promíchá a ujistíme se, že je močovina důkladně rozpuštěná.
- Do roztoku se přidá množství akrylamidu/bisakrylamidu dle požadované koncentrace gelu (viz. tabulka nahoře)
- Přidá se TBE, tak aby jeho finální koncentrace byla 1X
- Přidá se APS, tak aby jeho finální koncentrace byla 0,05 %. Roztok důkladně promíchejte.
- Nakonec se přidá TEMED, tak aby jeho finální koncentrace byla 0,05 %. Rychle a důkladně promícháme. Po přidání TEMEDu pracujeme urychleně, protože již začíná polymerizace.
- Pipetou nanese roztok mezi připravená skla a vložíme hřebínek. Ujistíme se, že nedochází k vytékání roztoku. Necháme polymerizovat 30-60 min při pokojové teplotě.

### Složení gelu pro denaturační PAGE:

| Koncentrace gelu   | 6%  | 8%  | 10% | 12% |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|
| Voda (ml)          | 6.4 | 5.9 | 5.4 | 4.9 |
| 5X TBE (ml)        | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Urea (g)           | 4.8 | 4.8 | 4.8 | 4.8 |
| 40% akrylamid (mL) | 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3.0 |
| 10% APS (μL)       | 100 | 100 | 100 | 100 |
| TEMED (μL)         | 10  | 10  | 10  | 10  |
| Celkový objem (ml) | 10  | 10  | 10  | 10  |

### Složení gelu pro nativní PAGE:

| Koncentrace gelu   | 6%  | 8%  | 10% | 12% |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|
| Voda (ml)          | 6.4 | 5.9 | 5.4 | 4.9 |
| 5X TBE (ml)        | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| 40% akrylamid (mL) | 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3.0 |
| 10% APS (ml)       | 100 | 100 | 100 | 100 |
| TEMED (μL)         | 10  | 10  | 10  | 10  |
| Celkový objem (ml) | 10  | 10  | 10  | 10  |

- Po ukončení polymerizace, odstraníme svorky, případně izolepu, vložíme do aparatury a vlijeme elektroforetický pufr TBE.



Je důležité používat TBE ze stejné lahve pro přípravu gelu a tak jako pufr do elektroforetické vany. Malé rozdíly v koncentraci solí mohou mít velký vliv na migraci nukleové kyseliny.

- Opatrně odstraníme hřebínek a ihned pipetou s tenkou špičkou důkladně propláchneme jamky, tak aby se odstranily zbytky nezpolymerizovaného roztoku, který zůstal v jamkách a výsledné proužky byly tak rovné. Necháme běžet elektroforézu naprázdno, tj. bez vzorků 15-30 min při 1-8 V/cm.
- Smícháme roztok nukleové kyseliny s nanášecím pufrům a tenkou špičkou naneste vzorky. Nanese velikostní marker. Necháme elektroforézu běžet při 1-8 V/cm, až se barvička nanášecího pufru dostane do požadované vzdálenosti.
- Vypneme elektroforézu, odstraníme boční vložky a oddělíme skla od sebe pomocí vložení plastového či kovového „klínku“ (např. staré platební karty). Opatrně sundáme gel a necháme jej barvit např. pomocí etidium bromidu.