
Ćwiczenie: ELEKTROFOREZA DNA W ŻELU AGAROWYM

Elektroforeza jest zjawiskiem elektrokinetycznym, w którym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego przemieszczają się makrocząsteczki obdarzone niezrównoważonym ładunkiem elektrycznym. Prędkość przemieszczania się takiej makrocząsteczki zależy od jej ładunku, rozmiaru, kształtu oraz oporu środowiska. Rozdziały elektroforetyczne mogą być prowadzone bezpośrednio w objętości elektrolitu (elektroforeza kapilarna) lub w nośniku elektroforetycznym wypełnionym odpowiednim elektrolitem. Nośnikiem elektroforetycznym może być np. bibuła, azotan celulozy, agarozę, poliakrylamid, który nie tylko stabilizuje elektrolit, ale przyczynia się także do lepszej separacji makrocząsteczek. Zastosowanie porowatych nośników tj. agarozę, poliakrylamid, potęguje efekt separacji poprzez dodatkowe frakcjonowanie makrocząsteczek na zasadzie sita molekularnego.

Kwasy nukleinowe w buforach o pH bliskim neutralnego obdarzone są ładunkiem ujemnym i poruszają się w stronę dodatnio naładowanej elektrody. Rozdział następuje na podstawie masy odpowiednich fragmentów, co pozwala na ustalenie ich wielkości, stopnia degradacji oraz zanieczyszczeń występujących w postaci białka lub RNA. Do rozdziału kwasów nukleinowych wykorzystuje się dwa typy żeli: agarozowy i poliakrylamidowy.

Agarozę jest polisacharydem będącym polimerem D-galaktozy i 3,6-anhydro-L-galaktozy, otrzymywanym jako frakcja agaru pochodzącego z krasnorostów. Bardzo łatwo rozpuszcza się w gorącej wodzie i pozostaje w stanie płynnym aż do temperatury ok. 40°C. Poniżej tej temperatury zestala się w postaci porowatego żelu. Sita molekularne agarozę wykazują dobre własności rozdzielcze. Rozmiary porowatości można regulować stosując agarozę w różnych stężeniach. Im wyższe jest stężenie agarozę, tym bogatsze usieciowanie i drobniejsze pory.

Do wizualizacji DNA po rozdziale elektroforetycznym stosuje się m.in. barwniki fluorescencyjne. Najczęściej stosowany jest bromek etydyny, który wiąże się z kwasem deoksynukleinowym. Obraz separacji makrocząsteczek może być uwidoczniony w świetle UV (świeci na pomarańczowo) i utrwalony za pomocą kamery cyfrowej z oprogramowaniem. Stosowanie bromku etydyny wymaga dużej ostrożności ze względu na jego silnie właściwości karcinogenne.

Celem ćwiczenia jest izolacja materiału genetycznego (DNA) z krwi i przeprowadzenie rozdziału elektroforetycznego wyizolowanego materiału genetycznego.

Aparatura i odczynniki:

- Agarozą,
- Bufor 1x TBE,
- Bufor ładujący Roti-Load DNA,
- DNAMarker Lambda Hind III 0,1µg/µL
- Roztwór bromku etydyny 5 mg/mL
- Aparat do elektroforezy z zasilaczem
- Lampa UV
- Kuchenka mikrofalowa
- Waga analityczna

Wykonanie ćwiczenia:

Przygotowanie żelu agarozowego:

Przygotować 60 mL 1% roztworu w buforze 1x TBE odważając odpowiednią ilość agarozy. Uzyskany roztwór ogrzewać w kuchenie mikrofalowej do całkowitego rozpuszczenia agarozy i pozostawić do ochłodzenia do temperatury około 60-70°C (naczynie można utrzymać w dłoni). Następnie dodać 50 µL roztworu bromku etydyny, dokładnie wymieszać i wylać do wypoziomowanej rynienki, nałożyć grzebień i pozostawić do polimeryzacji na ok. 30 min. Po polimeryzacji wyciągnąć grzebień, żel umieścić w aparacie do elektroforezy i zalać buforem 1x TBE.

Uwaga! Pracę z bromkiem etydyny należy wykonywać w rękawiczkach ochronnych.

Przygotowanie roztworów DNA do nałożenia na żel:

Do próbek typu eppendorf odpipetować 10 µL buforu ładującego (1x stężony) i 10 µL roztworu wyizolowanego uprzednio DNA.

Nałożenie próbek na żel:

Każdy roztwór nakładać do osobnej kieszonki. Do pierwszej kieszonki nakładać 10 µL markera wielkości DNA. Do kolejnych kieszonek nanieść objętość ok. 20 µL roztworów DNA do nałożenia na żel.

Elektroforeza:

Po nałożeniu próbek zamknąć aparat, kable odpowiednio podłączyć do zasilacza (kable podłącza Prowadzący zajęcia). Elektroforezę prowadzić pod napięciem 75 V przez 1h 20 min.

Aparat odłączyć od źródła prądu, żel przenieść pod lampę UV i obejrzyć rozdzielone kwasy nukleinowe.

Opracowanie wyników:

Dokonać analizy żelu agarozowego. Określić przybliżoną wielkość rozdzielanych fragmentów DNA.