

## Rozdział elektroforetyczny DNA

### Wprowadzenie:

Techniki elektroforetyczne wykorzystywane są do rozdzielania cząsteczek na podstawie szybkości poruszania się w polu elektrycznym. Szybkość ta powiązana jest z ich ładunkiem i masą. Kwasy nukleinowe w buforach o pH bliskim neutralnego obdarzone są ładunkiem ujemnym i poruszają się w stronę dodatniej anody. Rozdział następuje więc na podstawie masy odpowiednich fragmentów co pozwala na ustalenie ich wielkości, ustalenie degradacji preparatu oraz określenie ewentualnych zanieczyszczeń (białko, RNA). Do rozdzielania kwasów nukleinowych wykorzystuje się dwa typy żelów: agarozowy i poliakrylamidowy. Elektroforeza poliakrylamidowa (PAGE) umożliwia rozdzielanie mniejszych cząstek od 5 – 1000 pz, natomiast przy użyciu elektroforezy na żelu agarozowym możliwy jest rozdzielanie fragmentów nawet do 20 kbp.

Agarozę to frakcja agaru pochodzącego z krasnorostów. Jest to polisacharyd zbudowany z około 800 reszt galaktozy. Rozpuszcza się łatwo w wodzie i pozostaje w postaci płynnej do około 40°C, co pozwala na łatwe operowanie roztworem i tworzenie żeli o wybranych rozmiarach. Stosując różne stężenia roztworów agarozy można regulować porowatość żelu a przez to stopień rozdzielania w zależności od rozmiaru rozdzielanych cząstek. W celu wizualizacji prążków po rozdzielaniu elektroforetycznym stosuje się odpowiednie barwniki, najczęściej fluorescencyjne. Najpopularniejszym jest bromek etydyny, który umożliwia wizualizację już nawet 10 ng DNA. Wadą tego barwnika jest jednak to, iż posiada silne właściwości mutagenne i kancerogenne. Dlatego też pracując z tym odczynnikiem należy zachować szczególną ostrożność. Obecnie na rynku obecne są barwniki fluorescencyjne (SYBR), które nie wykazują się taką szkodliwością. Najczulszą metodą wizualizacji kwasów nukleinowych jest natomiast znakowanie radioaktywnymi izotopami.

Elektroforeza agarozowa jest powszechnie stosowana w laboratoriach biologicznych. Wykorzystuje się ją w takich eksperymentach biologii molekularnej jak: sekwencjonowanie, foot-printing, analizy produktów PCR, primer extension. Oprócz zastosowań analitycznych, wykonuje się również rozdzielania preparatywne, pozwalające na oddzielenie prążka o interesującej nas masie i elucji DNA do roztworu.

### Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie rozdzielania elektroforetycznego roztworów DNA i analiza otrzymanych prążków przy użyciu markera ( $\Lambda$  EcoR I Hind III Digest) zawierającego fragmenty DNA o określonych masach.

### Sprzęt i materiały:

- Agarozę
- Bufor TBE 0,5x
- Bufor do nakładania próbki na żel (sacharoza, błękit bromofenylowy)
- Marker  $\Lambda$  EcoR I Hind III Digest
- Roztwór bromku etydyny 10mg/ml
- Roztwory DNA 100  $\mu$ g/ml: Calf thymus, Salmon testes, Human placenta
  
- Kuchenka mikrofalowa
- Waga laboratoryjna
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet

- Probówki typu eppendorf
- Aparat do elektroforezy
- Zasilacz
- Transiluminator UV

### **Wykonanie ćwiczenia:**

1. Przygotowanie żelu agarozowego: przygotować 50 ml 1% roztworu agarozy w buforze 0,5x TBE. Ogrzewać roztwór w kuchenie mikrofalowej do całkowitego rozpuszczenia agarozy. Oczekać aż roztwór ochłodzi się do około 60°C (naczynie można utrzymać w dłoni) i dodać 10 µl roztworu bromku etydyny. Żel wylać do aparatu, nałożyć grzebień i pozostawić do polimeryzacji. Po polimeryzacji wyciągnąć grzebień i zalać żel buforem 0.5x TBE.
2. Przygotowanie roztworów DNA do nałożenia na żel: przygotować tak roztwory aby każdy zawierał ok. 1,5 µg DNA na kieszonkę, objętość ok. 15 µl . Każdy roztwór powinien zawierać bufor obciążający 1x stężony (bufor wyjściowy 5x stężony).
3. Nałożenie próbek na żel: każdy roztwór nakładany jest do osobnej kieszonki. Do pierwszej kieszonki nakładane jest 10 µl markera.
4. Elektroforeza: po nałożeniu próbek aparat jest zamykany, kable odpowiednio podłączane do zasilacza (kable podłącza Prowadzący zajęcia). Elektroforeza prowadzona jest pod napięciem 1000 mV przez 60 min.
5. Zakończenie elektroforezy: aparat odłączany jest od źródła prądu, żel opłukany w naczyniu z wodą destylowaną przenoszony jest pod transiluminator UV. W celu archiwizacji wykonuje się zdjęcie cyfrowe żelu.

### **Opracowanie wyników:**

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

### **Zagadnienia:**

1. elektroforeza (rodzaje, agaroz, bufor, migracja DNA)
2. wizualizacja DNA

### **Literatura uzupełniająca:**

1. L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999