

15. ELEKTROFOREZA ŻELOWA

1. Elektroforeza w żelu agarozowym DNA

Zasada:

Żel agarozowy jako nośnik w elektroforezie charakteryzuje się dużą zdolnością rozdzielczą, nieznaczną adsorpcją i niskim efektem elektroosmozy. Elektroforeza agarozowa jest powszechnie stosowana w metodyce izolacji i oczyszczania kwasów nukleinowych, identyfikacji produktów amplifikacji (reakcji łańcuchowej polimerazy PCR), jak również w specyficznych technikach analizy DNA, np. w SSCP (polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów) i w RLFP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Optymalne stężenie agarozy dopasowuje się do wielkości rozdzielanych fragmentów DNA. Rozdział DNA przeprowadza się w żelu, zazwyczaj o grubości około 5 mm w specjalnym aparacie do elektroforezy agarozowej. W celu określenia wielkości rozdzielanych fragmentów DNA, obok analizowanych próbek na żelu, umieszcza się wzorzec masowy. Dla uwidocznienia rozdzielonych frakcji można dodać bromku etydyny podczas sporządzania żelu lub dopiero po zakończeniu elektroforezy żel wybarwić roztworem tego bromku. Bromek etydyny wnika pomiędzy zasady azotowe w DNA i pod wpływem ultrafioletu emituje światło o zabarwieniu pomarańczowym. Po umieszczeniu wybarwionego żelu w transiluminatorze w świetle UV można oglądać świecące prążki.

Wykonanie:

- **Przygotowanie 2% żelu agarozowego:** naważkę 0,8 g agarozy rozpuścić w 40 ml buforu TBE 1x o pH 8,4 i ogrzewać na łaźni wodnej do rozpuszczenia (Uwaga! Nie doprowadzić do wrzenia!). Do roztworu agarozy dodać 20 µl roztworu bromku etydyny (o stężeniu 1 mg/ml). Agarozę schłodzoną do temperatury około 60°C wlać, unikając zapowietrzenia, do płytki z grzebieniem z aparatu do elektroforezy, tak aby grzebień został zanurzony na 1 mm od dna płytki i spowodował powstanie studzienek. Żel pozostawić na 30 minut w temperaturze pokojowej do zastygnięcia. Po zastygnięciu żel z płytką można wstawić do aparatu do elektroforezy.

- **Przygotowanie aparatu do elektroforezy:** po wstawieniu płytki z żelem do aparatu należy wlać bufor TBE 1x, wyjąć ostrożnie ograniczniki żelu i grzebień oraz uzupełnić poziom buforu do wysokości około 1 cm nad powierzchnią żelu.
- **Przygotowanie prób DNA do rozdziału:** do próbek zawierających 10 µl amplifikatu DNA dodać po 3 µl roztworu obciążającego, wymieszać. W osobnej probówce znajduje się wzorzec masowy (z fragmentami DNA o długości około 100–500 par zasad).
- **Nakładanie prób do studzienek:** Pipetą automatyczną pobrać 10 µl przygotowanej próby DNA i delikatnie wprowadzić do pierwszej studzienki, uważając, aby nie przebić żelu końcówką pipety lub zbyt płytko włożyć końcówkę pipety do studzienki, ponieważ spowoduje to wypłynięcie próby. Do jednej ze studzienek wprowadzić 7,5 µl wzorca masowego DNA.
- **Aparat połączyć ze stabilizatorem i włączyć zasilanie:** około 60 V. Gdy rozdzielany materiał wniknie do żelu, zwiększyć napięcie do 100 V. Elektroforezę prowadzić w temperaturze pokojowej do momentu osiągnięcia przez barwnik przeciwległego końca żelu, wówczas wyłączyć zasilanie. Żel wyjąć z aparatu wraz z podtrzymującą go płytką.
- **Żel umieścić w transiluminatorze,** włączyć światło UV i obserwować pasma DNA. Oszacować na podstawie wzorca masowego wielkość rozdzielanych produktów amplifikacji.

Uwaga! Bromek etyldyny jest silnym mutagenem, unikać kontaktu ze skórą, wszystkie czynności wykonywać w rękawiczkach lateksowych.

2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Zasada:

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym jest powszechnie stosowaną techniką do rozdzielania i oczyszczania, głównie białek oraz kwasów nukleinowych. Zastosowanie tego nośnika podczas elektroforezy ma korzystny wpływ na rozdział, ponieważ żel poliakrylamidowy jest sitem molekularnym, przez pory którego przechodzą małe cząstki, a większe są zatrzymywane. W związku z tym ten rodzaj elektroforezy charakteryzuje się dużą rozdzielczością i czułością, co pozwala na analizowanie mikrogramowych ilości rozdzielanych mieszanin. Wielkość porów w żelu można kontrolować przez odpowiednie stężenie akrylamidu i metylenobisakrylamidu, który tworzy wiązania poprzeczne. Technika tą można skutecznie rozdzielać DNA, zarówno fragmenty dwuniciowe, jak i jednoniciowe (po denaturacji). W celu oceny wielkości rozdzielanych cząstek DNA rozdział prowadzi się w obecności wzorca masowego DNA. Przeznaczone są do tego specjalne aparaty do elektroforezy poliakrylamidowej.

Rozdzielone tą techniką cząsteczki DNA wybarwia się zazwyczaj azotanem srebra.

Wykonanie:

- **Przygotowanie 8% żelu poliakrylamidowego z 5% glicerolem:**
8 ml 40% poliakrylamidu, 2 ml buforu TBE pH 8,4, 2 ml glicerolu 400 µl 10% nadsiarczanu amonu zmieszać i uzupełnić wodą destylowaną do 40 ml. Dodać 40 µl TEMED. Żel wlać do pełna pomiędzy szyby aparatu i wsunąć grzebień, który wytworzy w żelu studzienki. Żel pozostawić do spolimeryzowania.
- **Przygotowanie aparatu do elektroforezy:** szyby ze spolimeryzowanym żelem umieścić w aparacie. Do aparatu wlać bufor elektroforetyczny TBE. Wyjąć grzebień, po czym można przystąpić do nakładania prób przeznaczonych do rozdzielania.
- **Nakładanie prób DNA do studzienek w żelu:** próby DNA, dwuniciowe i jednoniciowe (po denaturacji) gotowe do rozdzielania, przygotowane przez prowadzących zajęcia, nakładać pipetą automatyczną. Do jednej ze studzienek nałożyć otrzymany gotowy wzorzec masowy.
- **Aparat połączyć ze stabilizatorem i włączyć zasilanie:** napięcie około 250 V, elektroforezę prowadzić w temperaturze około 5°C.
- **Wybarwianie żelu azotanem srebra:** umieścić żel w wanience, dodać 400 ml 20% TCA i postawić na kołysce laboratoryjnej na 6 minut. Wylać płyn. Dodać 400 ml 20% formaldehydu i znów postawić na kołysce laboratoryjnej na 6 minut. Wylać płyn. Płukać wodą dwukrotnie po 2 minuty, mieszając delikatnie. Dodać 400 ml 0,4% AgNO₃ i postawić na kołysce laboratoryjnej na 10 minut. Wylać płyn. Płukać wodą 2 minuty i dwukrotnie po 0,5 minuty, mieszając delikatnie. Wylać płyn. Dodać 2,5% roztworu węglańku sodu z 2% formaldehydem (stosunek 149:1), mieszać na kołysce laboratoryjnej do momentu pojawienia się prążków. Wylać płyn. Dodać 400 ml 5% kwasu octowego, kołysać 7 minut. Wylać płyn. Żel zalać wodą, można przechowywać w lodówce albo po dokładnym wypłukaniu umieścić między mokrą folią w ramach przeznaczonych do suszenia żelu.

ODCZYNNIKI

Agaroza; bufor TBE 10x stężony o pH 8,4 (107,8 g TRIS, 55 g kwasu borowego, 3,7 g EDTA rozpuścić i uzupełnić wodą do 1000 ml; przed użyciem rozcieńczać 10-krotnie); roztwór obciążający (0,25% błękit bromofenolowy, 0,25% ksylen cyjanolowy, 40% sacharozę rozpuścić i uzupełnić wodą do 100 ml); 0,1% roztwór bromku etydyny, wzorzec masowy DNA; 40% poliakrylamid (mieszanina akrylamidu i bisakrylamidu w stosunku 37,5:1).