

Obsah DNA Electrophoresis Kitu a jeho skladování

DNA Electrophoresis Kit obsahuje veškerý potřebný materiál a přístrojové vybavení na provádění horizontální gelové elektroforézy.

Experiment provádějí osoby zaškolené na práci s danými přístroji.

Při přípravě vzorků a jejich analýze jsou dodržovány bezpečnostní postupy dle zásad správné laboratorní práce.

Chemikálie a reagentie obsažené v kitu

Množství	Reagencie	Skladování	Stabilita od dodání
500 g	Agaróza	RT	4 roky
1 l	10x TBE pufr	RT	4 roky
1 l	10x TAE pufr	RT	4 roky
1 ml	EZ-Vision Three™ DNA Dye (Amresco; N313)	4°C, ve tmě	1 rok
10 x 250 µl	100bp DNA Ladder	RT -20°C	6 měsíců 1 rok

Přístroje a pomocná zařízení obsažená v kitu

Napěťový zdroj 300V

Aparatura pro horizontální elektroforézu

Forma na gel 10 x 11,5 cm

Hřebínek: 1,5 mm, 12 jamek

1 mm, 16 jamek



Materiál a přístrojové vybavení, které není součástí kitu

Ultra Pure voda

Špičky do automatických pipet, na jedno použití

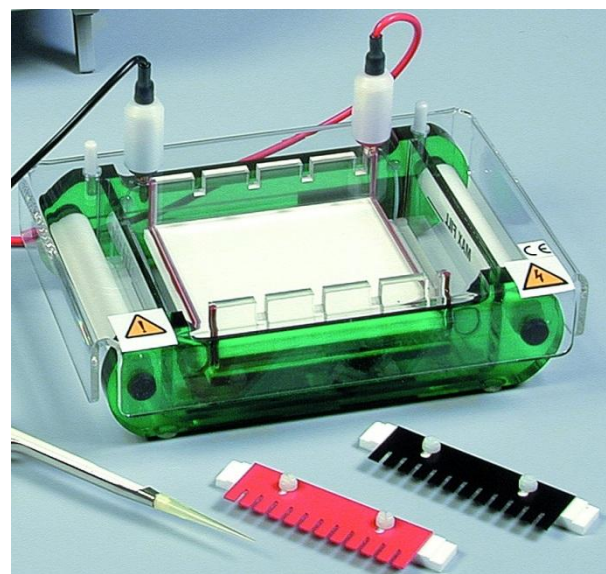
Mikrozkumavky

Latexové rukavice

Transluminátor se snímacím zařízením (např. MaestroGen; MLB-21)

Minispin

Laboratorní váhy



Návod k použití

Elektroforéza je hojně využívána k analýze velikosti fragmentů DNA či RNA podle standardu fragmentů známých velikostí. Využívá k dělení látek vlastnosti odlišné pohyblivosti nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli. Agaróza jako gelový nosič je tvořena sítí polymerních vláken, kterou se separované molekuly nukleových kyselin pohybují různou rychlostí v závislosti na jejich velikosti. Použitým elektrolytem je TBE pufr.

Příprava matrice a pufru

K přípravě gelu je použit TBE pufr, který obsahuje Tris, kyselinu boritou a EDTA. Pro dělení fragmentů nukleových kyselin je vhodné používat 0,5-1x koncentrovaný pufr. K přípravě se používá zásobní roztok 10x TBE v ultrapure vodě.

Př.: Pro přípravu 1 litru 0,5x TBE odeberte ze zásobního roztoku 50 ml 10x TBE a doplňte do objemu 1l ultrapure vodou.

Pro přípravu agarózového gelu rozpustěte práškovou agarózu v 0,5x TBE. Vhodná koncentrace agarózy je volena podle velikosti dělených fragmentů NK. Příslušné množství agarózy v pufru vařte v tlustostěnné skleněné nádobě v mikrovlnné troubě až do úplné homogenizace obsahu – při míchání se tavenina jeví čirá. Směs nechte vychladnout cca 5 minut při pokojové teplotě a poté ji nalijte do formy na gel s vloženým hřebínkem. Výška gelu je dána velikostí hřebínků. Gel nechte ztuhnout minimálně 1h při pokojové teplotě, poté ho přeneste do elektroforetické vany a zalijte 0,5x TBE tak, aby byl zcela ponořen.

Př.: 1,5% agarózový gel připravte rozpuštěním 1,5 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE.

V případě, že jsou gely připraveny dopředu, mohou být uskladněny v lednici v čistém sáčku s uzavíratelným zipem.

Elektroforetické dělení

Vzorky DNA stočte na minispinu a ke každému přidejte fluorescentní barvičku EZ-Vision® DNA Dye v poměru DNA:barvička = 5:1. Barvičku nejprve alespoň 20 s vortexujte. Dále připravte velikostní marker, který je pro experiment vybrán podle odhadované délky dělených fragmentů DNA. K markeru přidejte barvičku ve stejném poměru marker:barvička = 5:1.

Vzorky důkladně promíchejte špičkou a naneste do jamek v předem připraveném gelu. Pokud nejsou jamky dostatečně hluboké a hrozí mísení vzorků, je na místě použít tzv. nanášecí pufr, který způsobí usazení vzorku na dno jamky (např. glycerol, přidejte 0,5 µl glycerolu k 6 ul směsi DNA vzorku s barvičkou).

Po nanesení všech vzorků, včetně velikostního markeru, na gel, elektroforetickou soupravu zakryjte víkem a připojte ke zdroji elektrického napětí. Napětí je zvoleno podle velikosti dělených fragmentů, běžně je volena hodnota v rozmezí 80-150V.

V průběhu elektroforetického dělení fragmentů kontrolujte čelo tvořené barvičkou EZ Vision. Barvička obsahuje tři barevné markery putující jako 10, 400 a 4000 bp. Po dosažení vhodného

rozdělení zdroj napětí vypněte a gel opatrně přeneste na transluminátor. Fragменты DNA jsou viditelné pod UV zářením vlnové délce 364 nm, pomocí snímacího zařízení je zhotoven elektroforeogram.

Vlastnosti a optimální použití Agarózy

GEL (%)	Optimální rozmezí délky fragmentů (bp)	Doporučený pufr
0,8	800 – 22,000	TAE
1	500 – 10,000	TAE/TBE
1,2	400 – 7,000	TAE/TBE
2	250 – 5,000	TBE

Senzitivita a vlastnosti EZ Vision Three DNA Dye

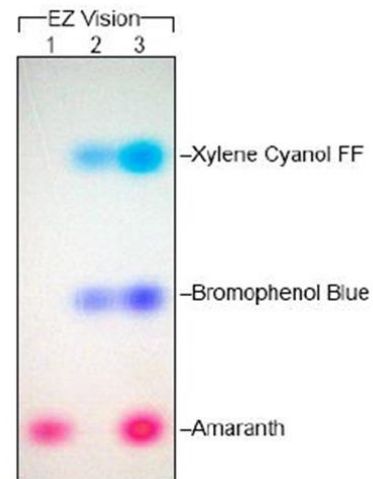
Pomocí barvičky EZ Vision Dye lze na gelu zobrazit 6 ng DNA o velikosti 400 bp.

K zobrazení fragmentů menších než 200 bp naneste alespoň 100 ng DNA.

Excitace: 364 nm

Emise: 454 nm

Barvička obsahuje tři markery putující jako 10 bp (růžová), 400 bp (tmavě modrá) a 4000 bp (tyrkysová) při použití 1% agarózového gelu.



100 bp DNA Ladder

Velikostní standard při agarózové elektroforéze. Rozmezí fragmentů je 100-1500 bp. Bandy 500 a 1500 bp slouží jako referenční a vykazují vyšší intenzitu obarvení. Koncentrace 100 µg/ml.

Nanášejte 5 µl na jamku.

