

Cvičení č. 2

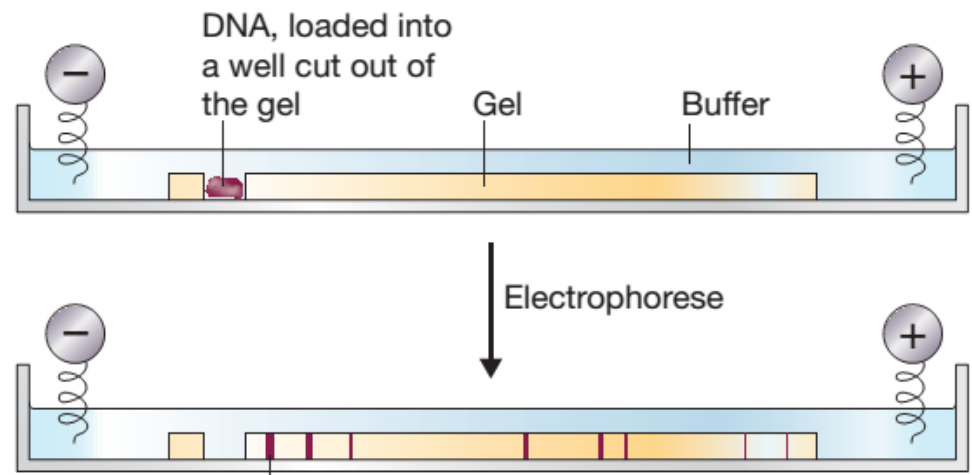
# **Elektroforéza a purifikace produktů PCR, příprava na sekvenaci**

Přírodovědecká fakulta MUNI

# ELEKTROFORÉZA (ELFO) NUKLEOVÝCH KYSELIN (NK)

## Princip ELFO

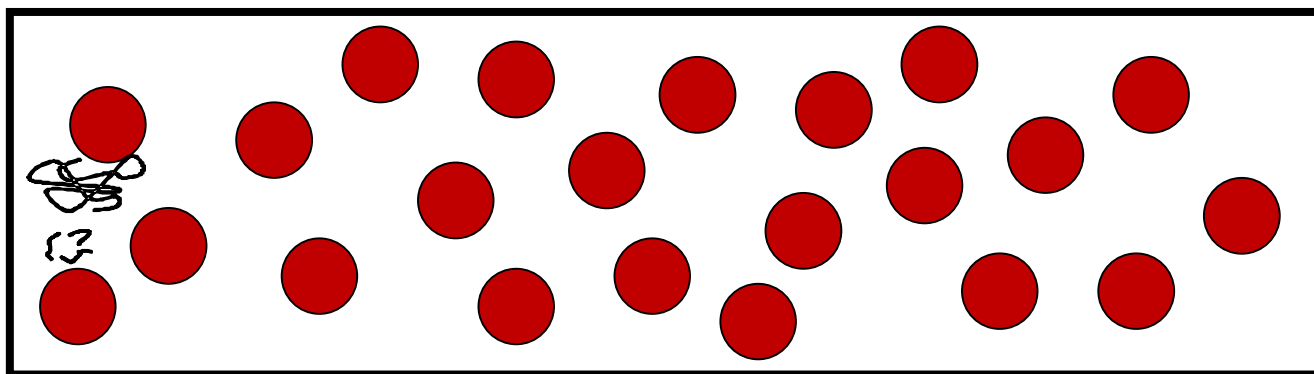
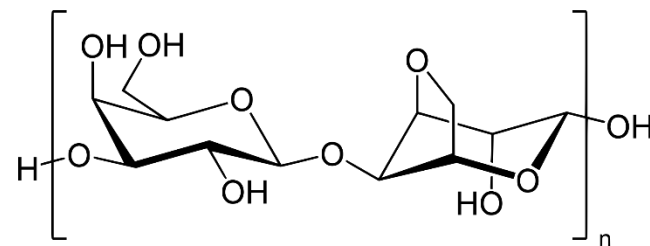
- Pohyb nabitých molekul v elektrickém poli
- Dělení molekul na základě rozdílných pohyblivostí, které závisí na náboji, velikosti (hmotnosti) a tvaru



## Zónová ELFO (na nosiči)

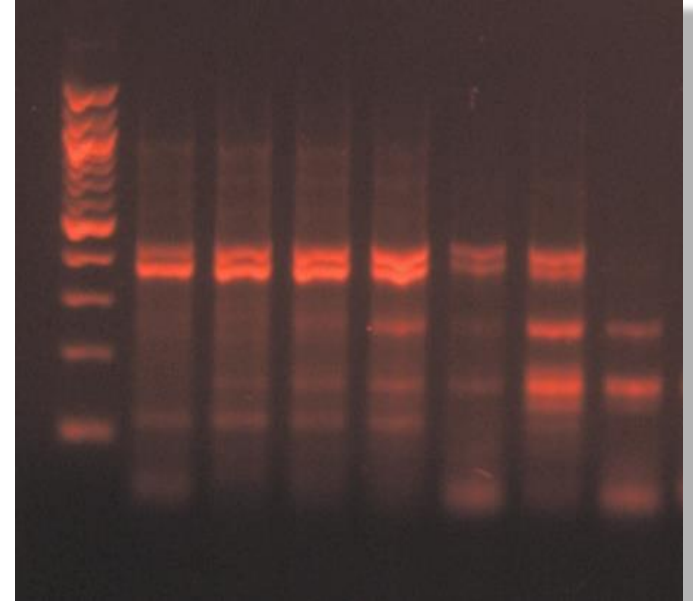
# GELY A POHYB ČÁSTIC V NICH

- Agaróza
- Síťovitá struktura s póry – dle koncentrace polymeru
- Agarózové gely: 100 bp až 50 kb
- Pohyb NK ke katodě
- Rychlost pohybu závisí na velikosti molekuly

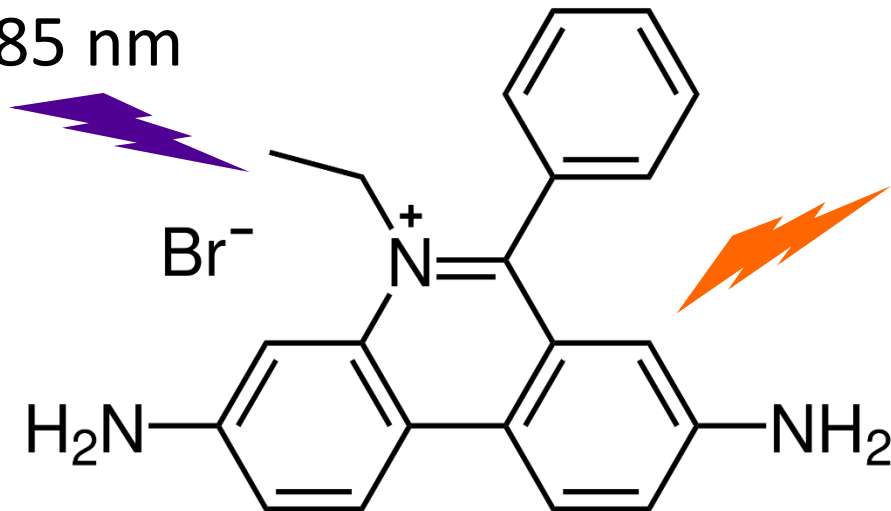


# VIZUALIZACE NK V GELU

- Ethidiumbromid
- SYBR GREEN, SYBR Safe
- Stříbro

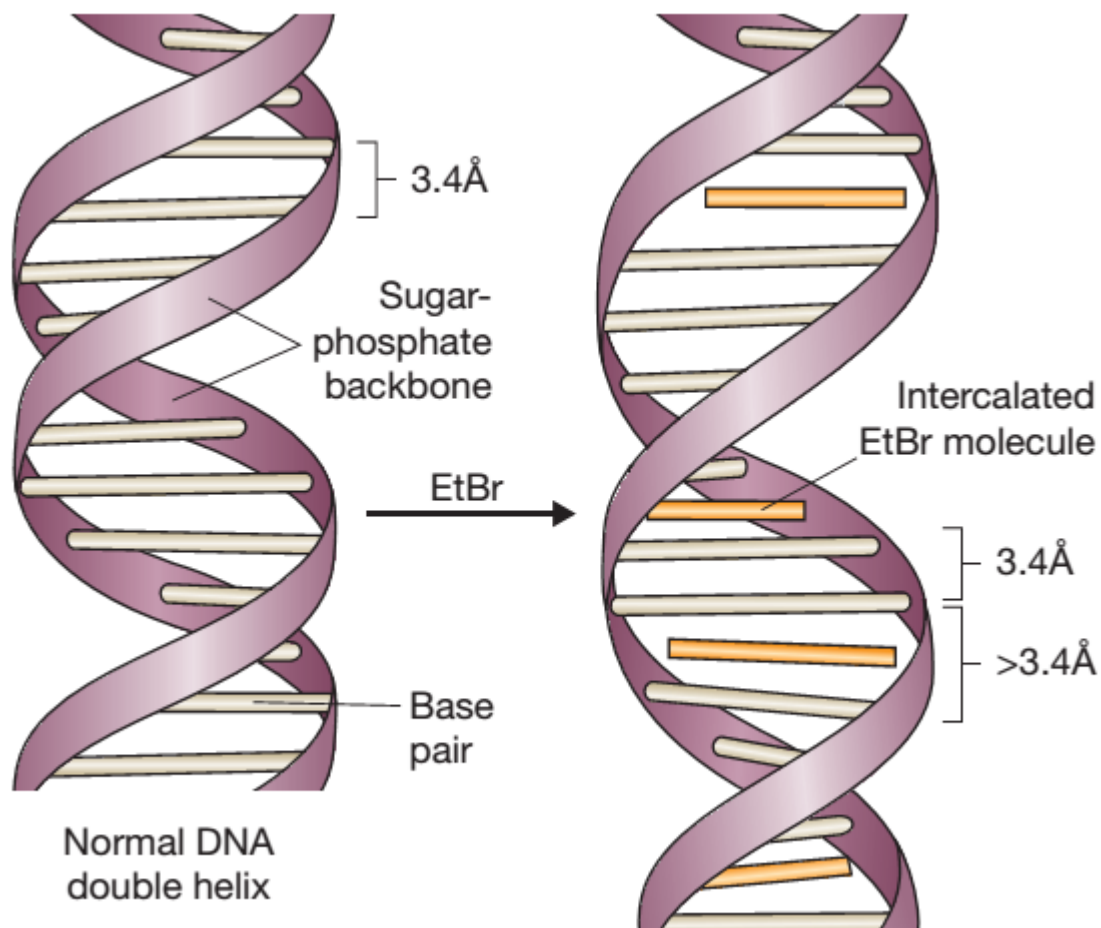
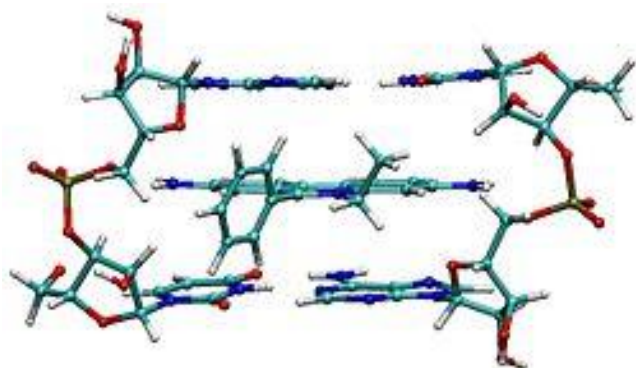
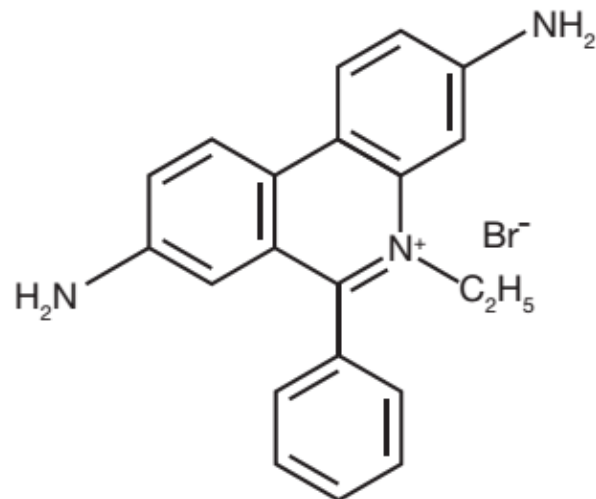


285 nm

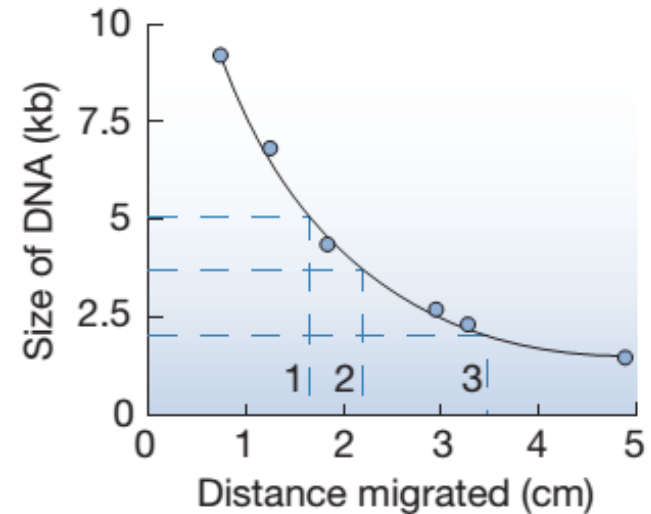
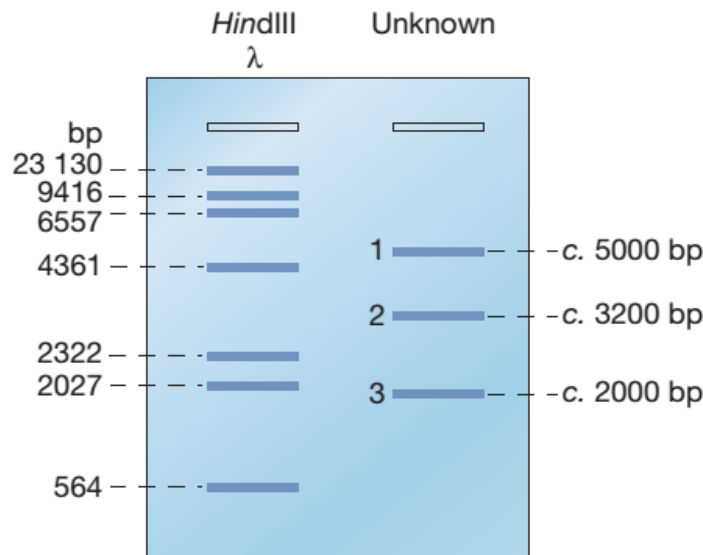


590, 605 nm

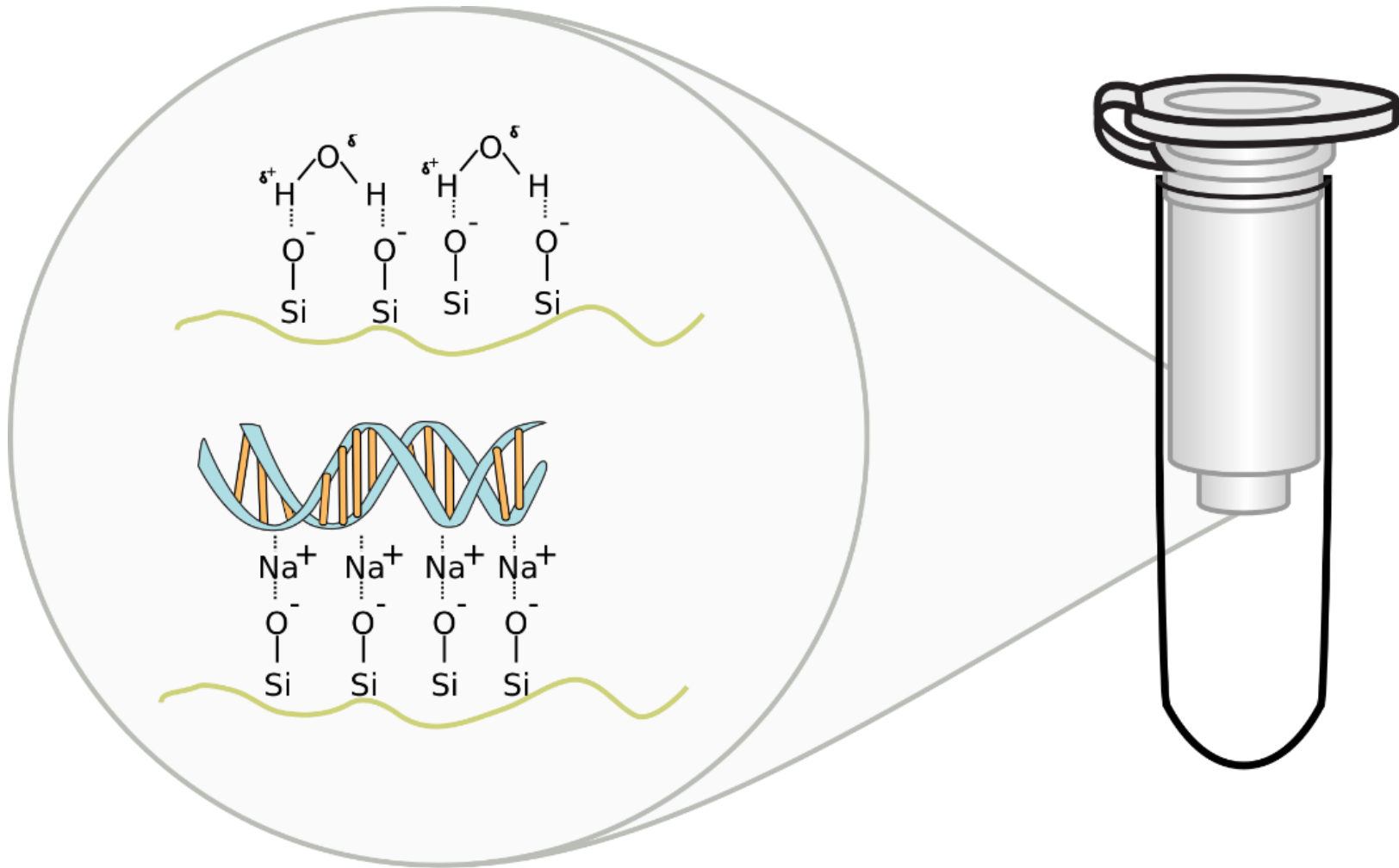
# INTERKALACE ETHIDIUMBROMIDU



Rychlost pohybu makromolekul je nepřímě úměrná  
logaritmu velikosti molekul => nutnost srovnání s  
 velikostními standardy



# CHROMATOGRAFIE PRO IZOLACI A PURIFIKACI NK



<https://en.wikipedia.org>

# KOMERČNÍ KITY PRO IZOLACI NK (SPIN COLUMNS)

- Kolonky s **křemičitou maticí**
- Vazba usnadněna **guanidinium thiokyanátem a solí**
- Kolonka zachytí fragmenty větší než 50-100 bp

