

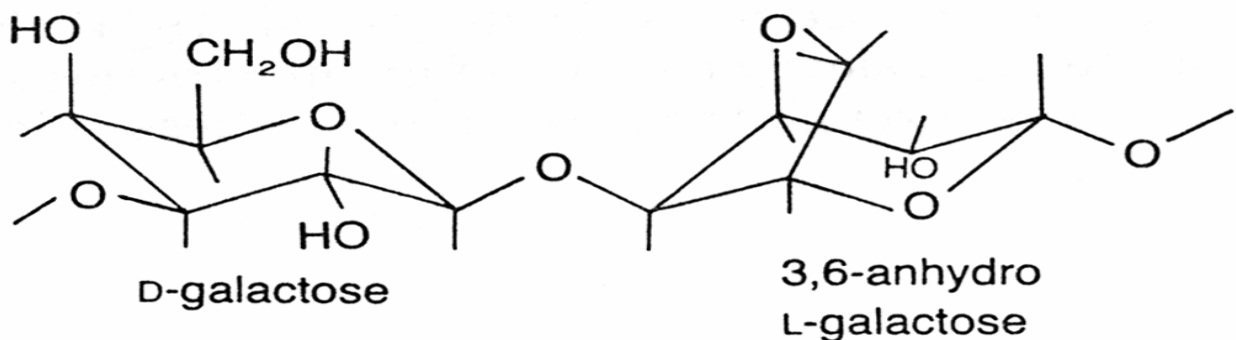
Gelová elektroforéza - GELY

Separace biomolekul (proteinů, NK) v gelech

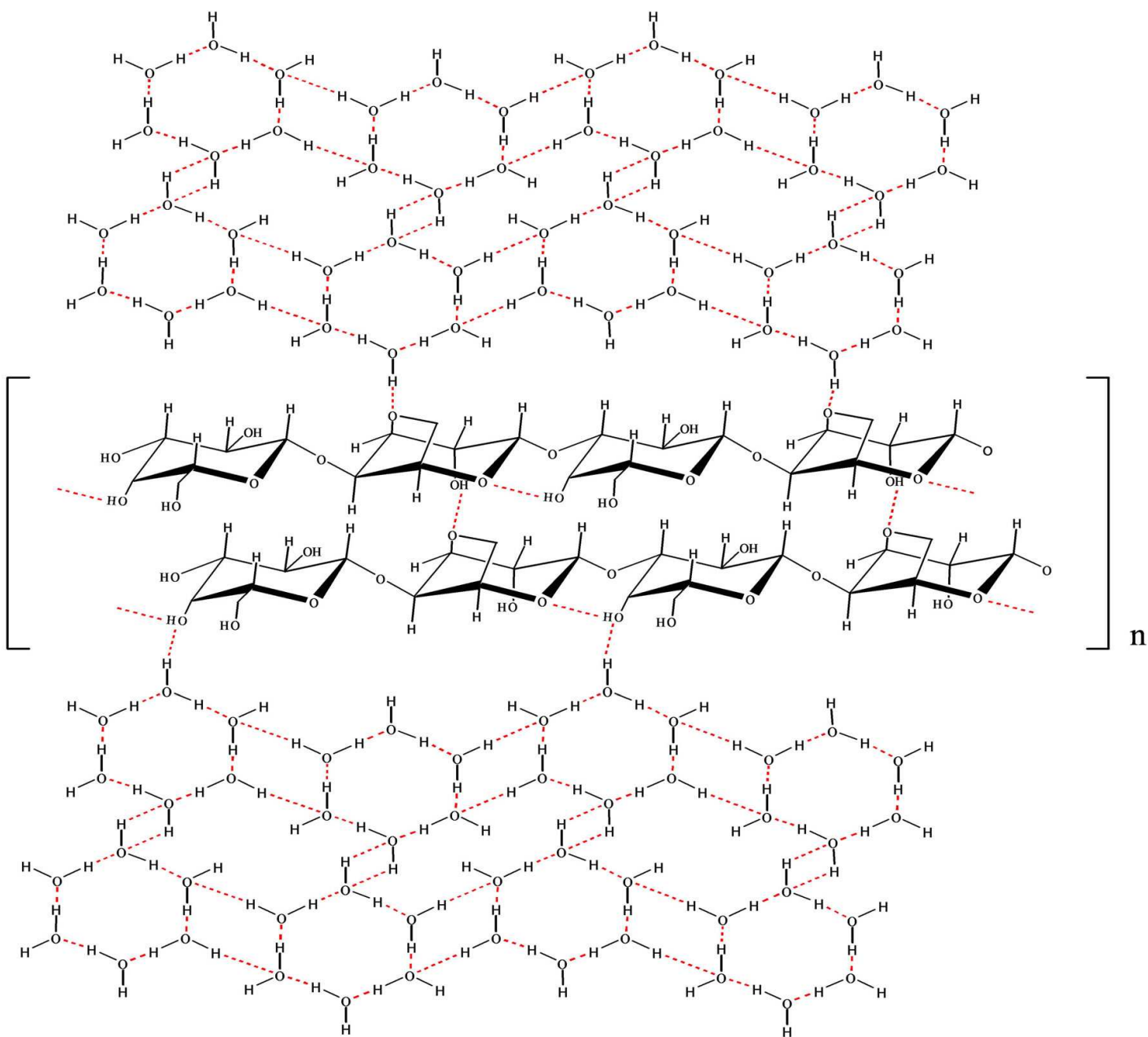
Jako nosiče se používá **agaróza** (100 – 50 000 bp)
nebo **polyakrylamid** (10 – 1 000 bp)

nosiče vytvářejí síťovou strukturu polymerních molekul s póry

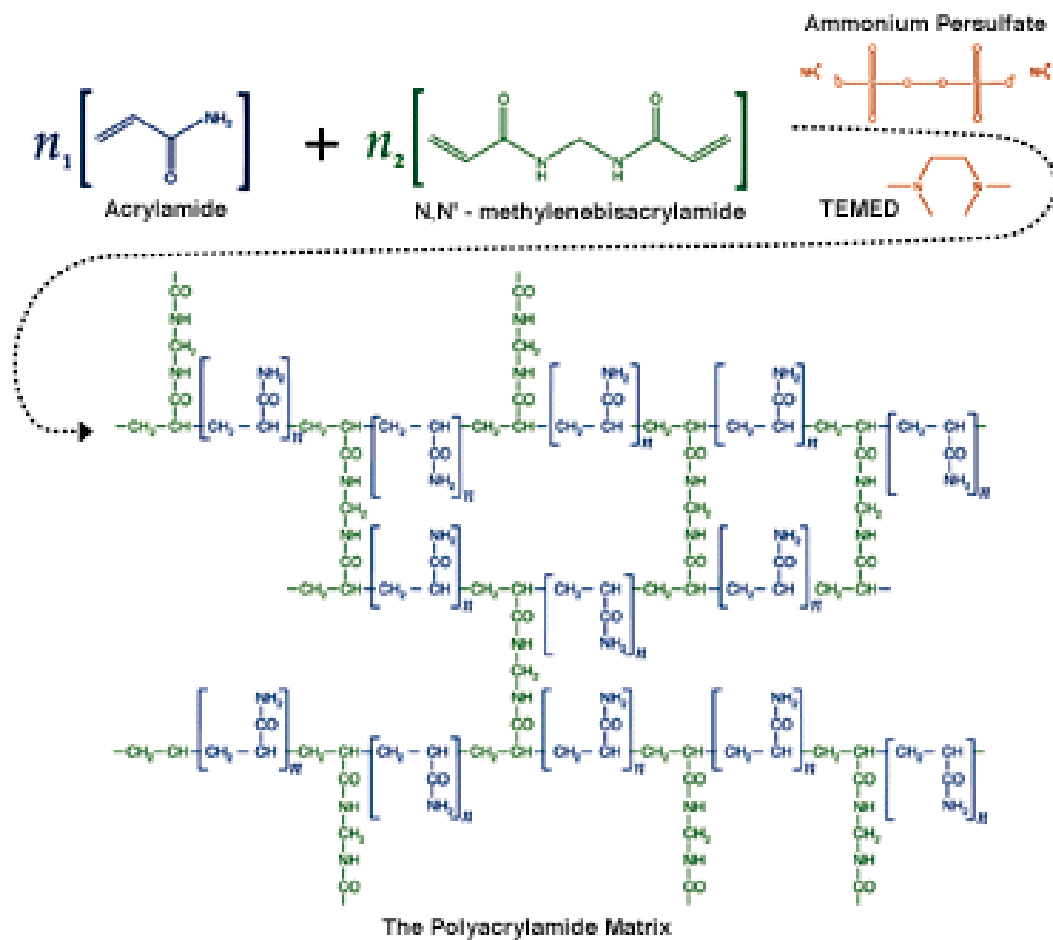
Základní jednotka agarózy



Agaróza je lineární polymer (původ z mořské řasy)



Polyakrylamid



Velikost pórů lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru

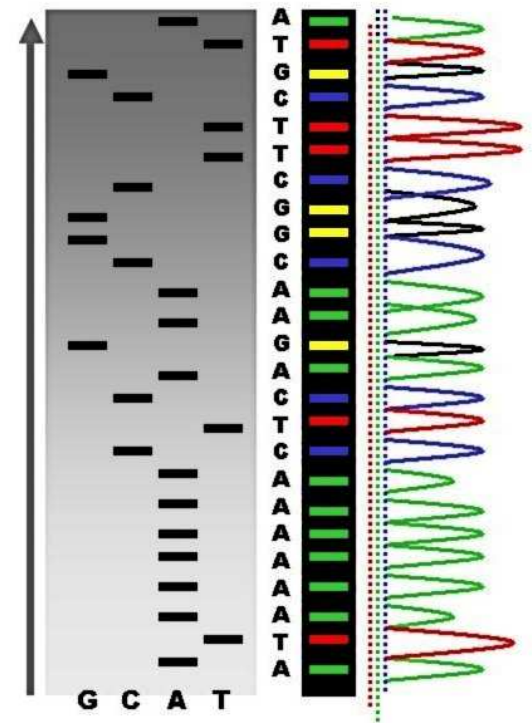
Optimální velikost separovaných molekul

- agarózové gely 100 bp až 50 000 bp
- polyakrylamidové 10 až 1000 bp

Koncentrace agarózy	Rozsah dělení ds DNA
0,3 %	5 – 60 kb
0,6 %	1 – 20 kb
0,7 %	0,8 – 10 kb
0,9 %	0,5 – 7 kb
1,2 %	0,4 – 4 kb
1,5 %	0,2 – 3 kb
2,0 %	0,1 – 2 kb
3,0 %	0,05 – 0,5 kb
4,0%	0,005 – 0,2 kb

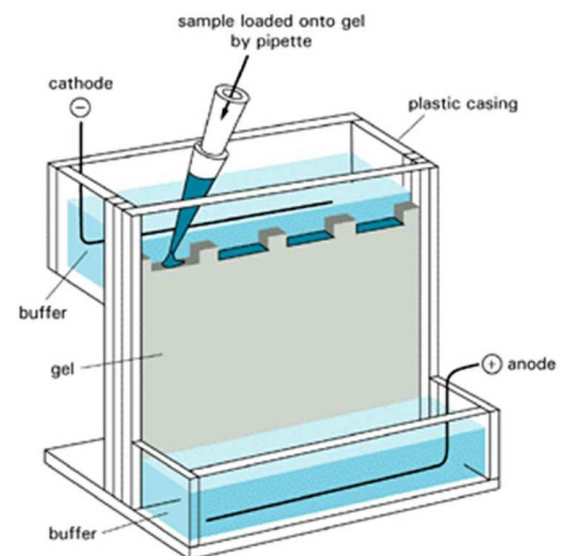
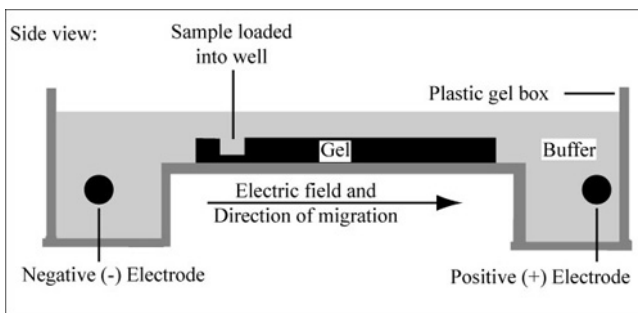
PAGE gely

– rozlišení až 1 nukleotid - sekvenace



Uspořádání elektroforézy

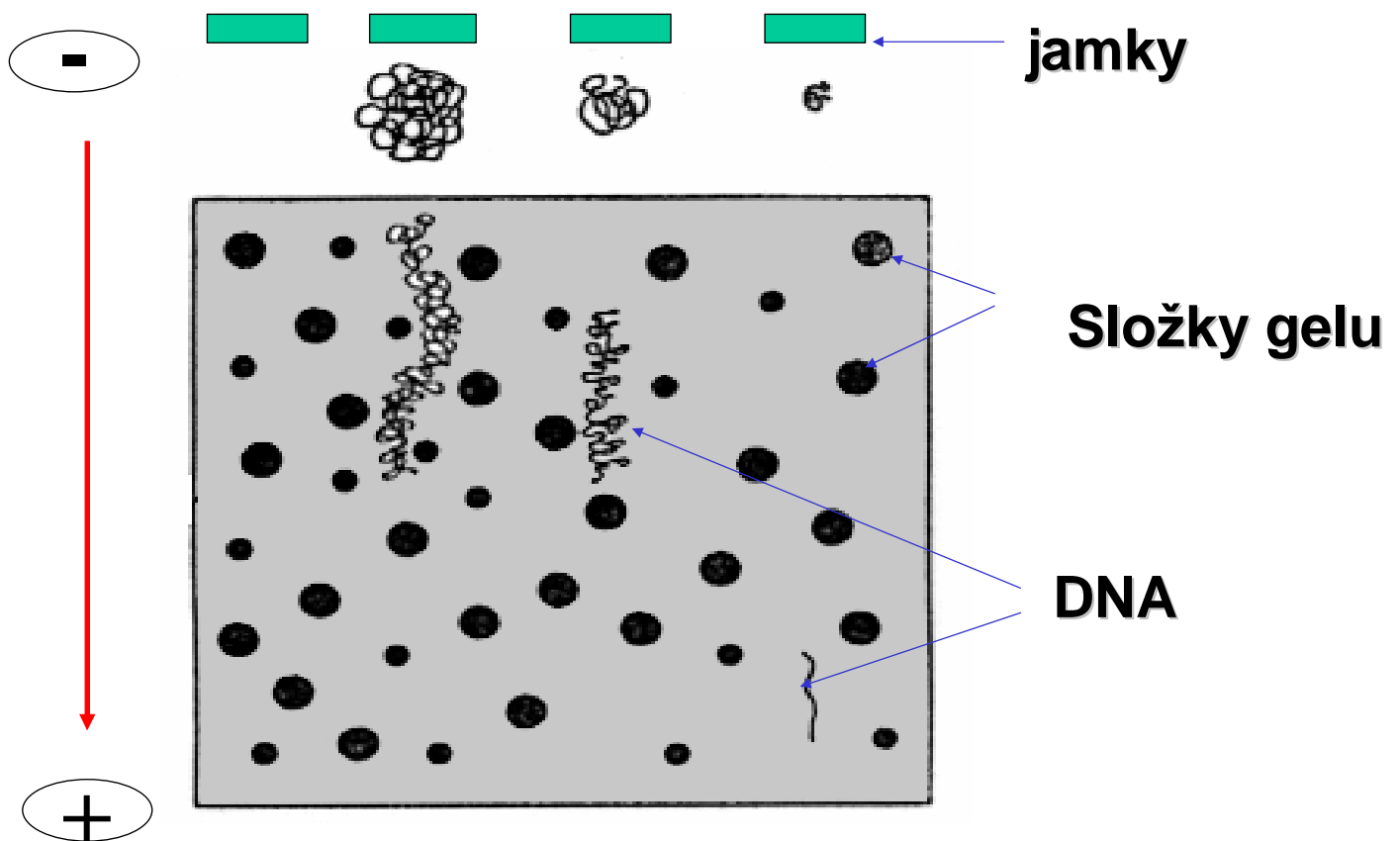
- Horizontální (agarózové gely)



- Vertikální (PAGE)

Princip DNA ELFO

pohyb DNA s negativním nábojem v neutrálním gelu a elektroforetickém pufru v elektrickém poli k anodě



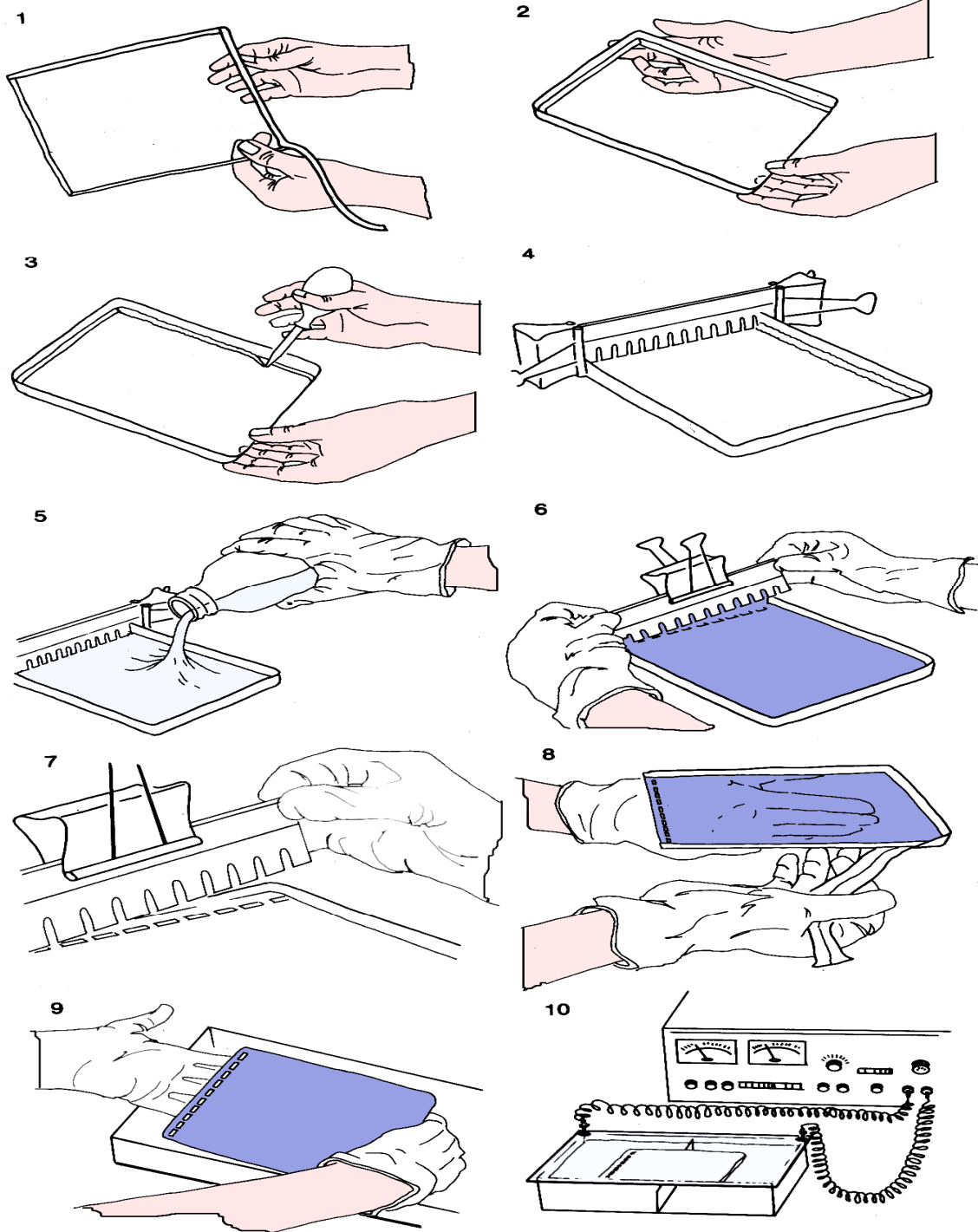
ELFO pufry:

TRIS-acetátový (TAE): 0,04 M Tris-acetát, 0,002 M EDTA

TRIS-fosfátový (TPE): 0,08 M Tris-fosfát, 0,008 M EDTA

TRIS-borátový (TBE): 0,089 M Tris-borát, 0,089 M kyselina boritá, 0,002 M EDTA

AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA – příprava gelu



Nanášecí (barvicí pufr) - 6× koncentrovaný

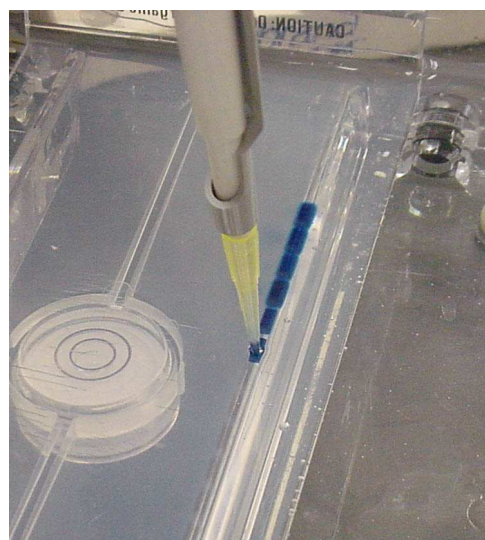
- barevný

	0,5 – 1,4 % agaróza	4 % polyakrylamid	6 % polyakrylamid
Xylencyanol	4 kb	170 bp	105 bp
Bromfenolová modř	300 bp	40 bp	25 bp
Oranž G	50 bp	-	-
Bromkresolová zeleň	Pouze pro alkalickou agarózovou elektroforézu 100 bp		

- Hustý - 40% (w/v) sacharóza

- Ficol 400

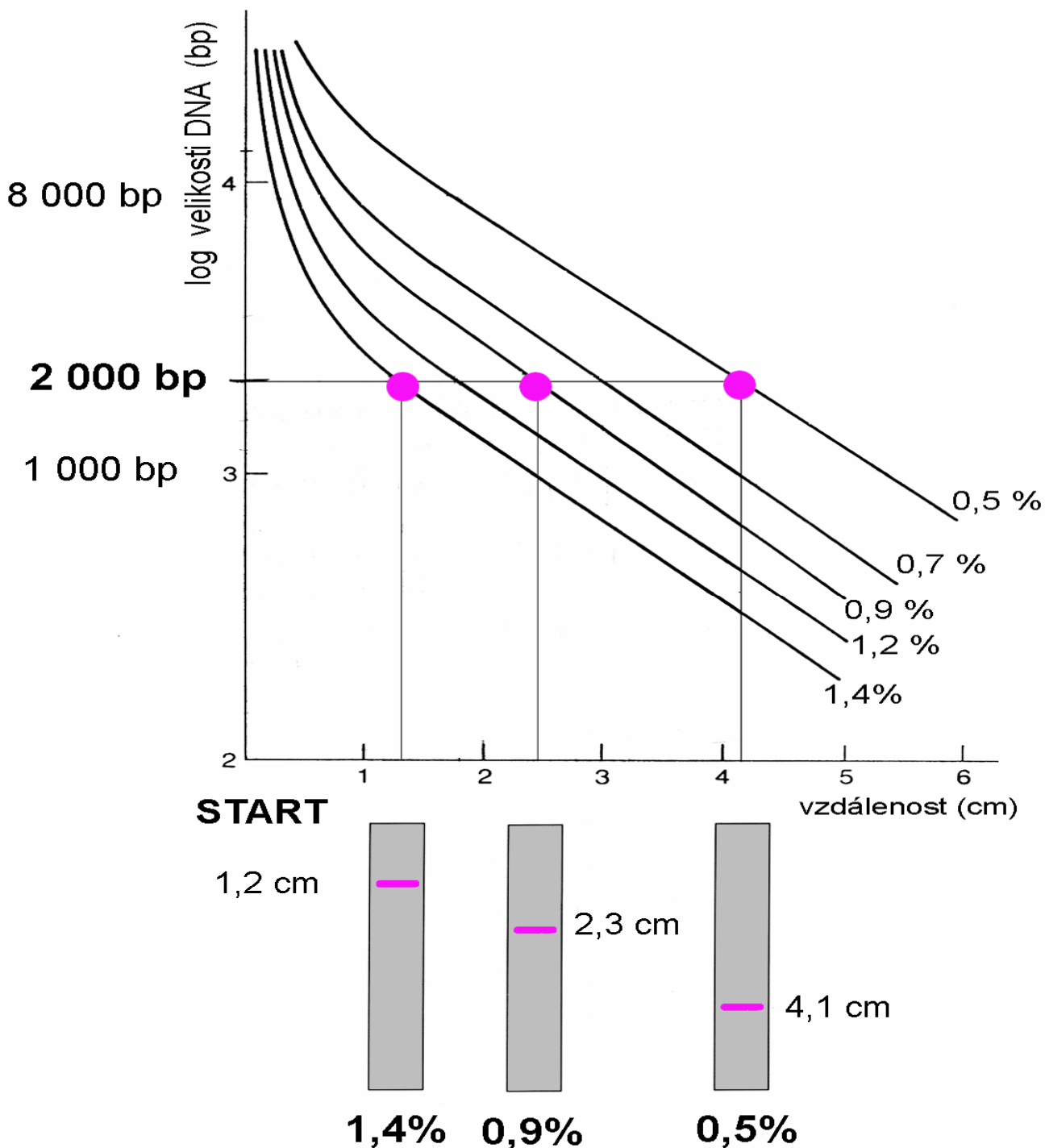
- glycerol



Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

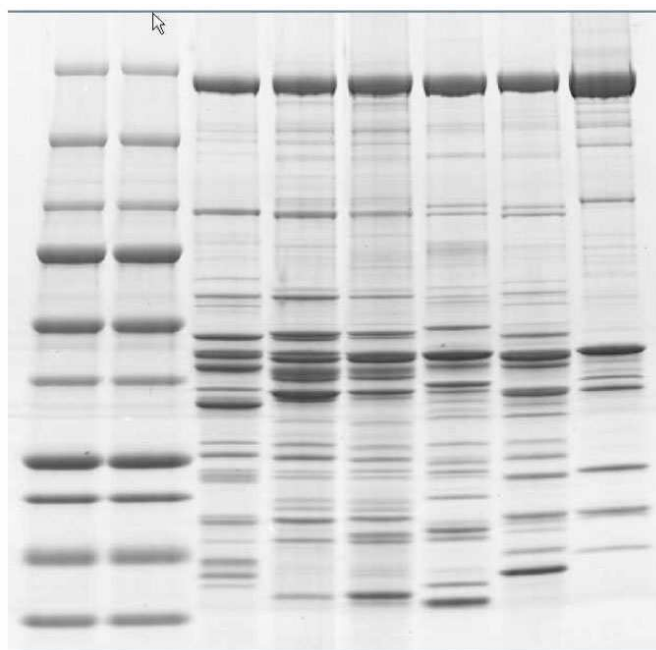
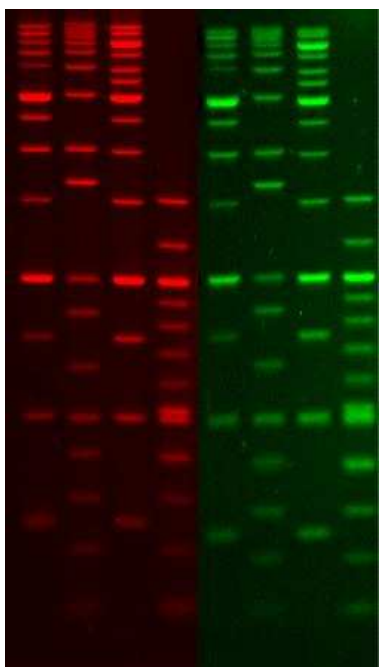
- Konformace DNA
- Složení elektroforetických pufrů (iontová síla-TAE a TBE)
- Složení bazí a teplota (u PAGE)
- Přítomnost interkalačních barviv
- Směr elektrického pole (PFGE > 50 kb)
- Napětí (5V/cm)
- Koncentrace gelu
- Velikost DNA

Pohyb fragmentů DNA v gelu a jejich separace



Metody detekce

- Interkalační barviva (ethidium bromid)
- Indolová a imidazolová barviva (DAPI)
- Stříbro
- Kyaninová barviva (SYBR Gold, SYBR Green)
- Radioaktivní značení NK



Ethidium bromid

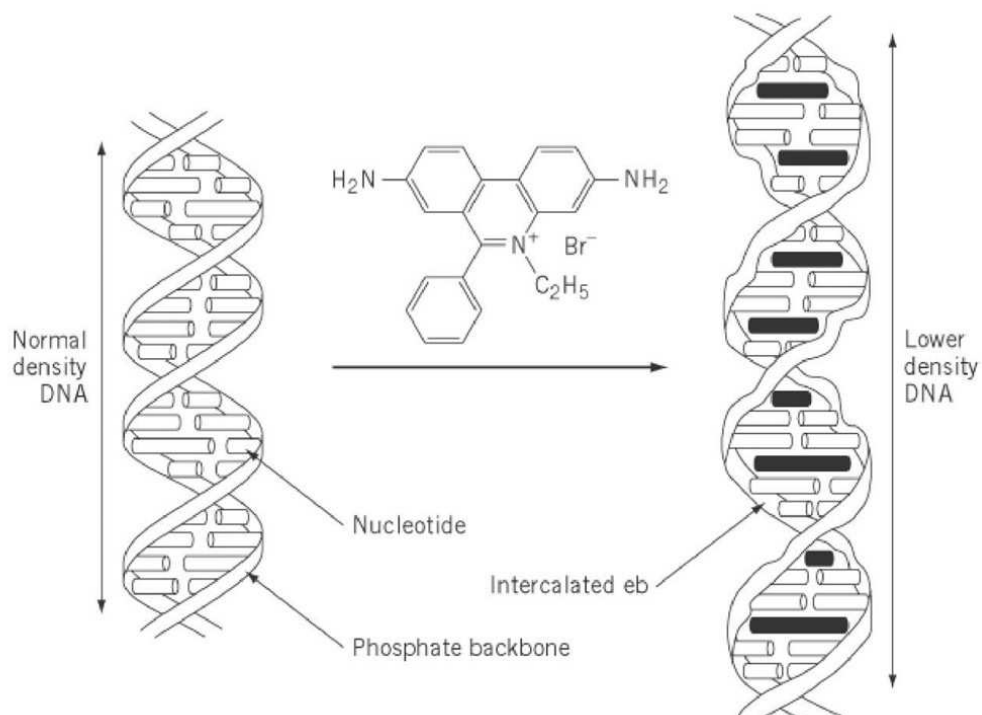
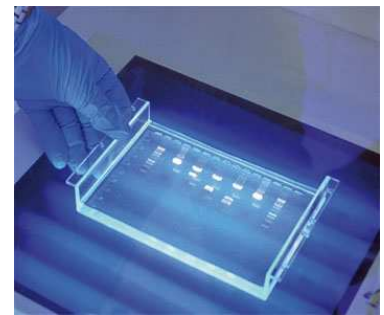
Mutagen a karcinogen

Interkalace do dsDNA (vazba i na helixy ssDNA a RNA)

Po interkalaci – 20-30x větší fluorescence (fixní pozice v DNA)

Transiluminátor (UV ~ 302 nm), EtBr-DNA emise 590 nm

Citlivost 1-5 ng



Postup přípravy gelu pro ELFO a nanášení vzorků

- **Navážit agarózu a smíchat s 1×TAE pufrem, tak aby vznikl 1% gel**
- **Rozvařit agarózu v mikrovlnce.**
- **Opatrně promíchat a vytemperovat na 50 °C**
- **Nalít do tvořítka, tak, aby nevznikly bubliny a výška gelu odpovídala 5 mm**
- **Nechat gel utuhnout (20 - 30 min)**
- **Přelít gel 1 × konc. TAE pufrem**
- **Opatrně vysunout hřeben z gelu**
- **Nanášet vzorky do kterých byl přidán nanášecí pufr**
- **Provést elektroforézu**

Plazmid pUC18 -2,69 kbp

