



DNR ELEKTROFOREZĒ

LSMU MEDICINOS FAKULTETAS
BIOCHEMIJOS KATEDRA
2018 m. vasario 22 d.

Darbo planas

- DNR struktūra ir tyrimo metodai.
- Elektroforezės kaip tyrimo metodo taikymas DNR tyrimams. Agarozės geliai.
- E-Gel® iBase™ Power System technologija - greita DNR analizė.
- DNR preparato paruošimas, DNR kiekio įvertinimas.
- DNR pavyzdžio užnešimas ant agarozės gelio.
- Rezultatų įvertinimas.

DNR STRUKTŪRA

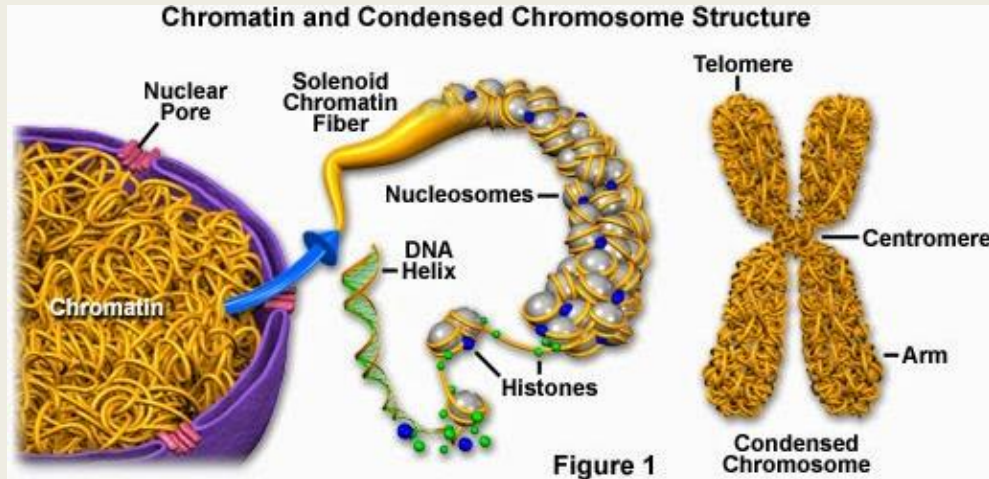
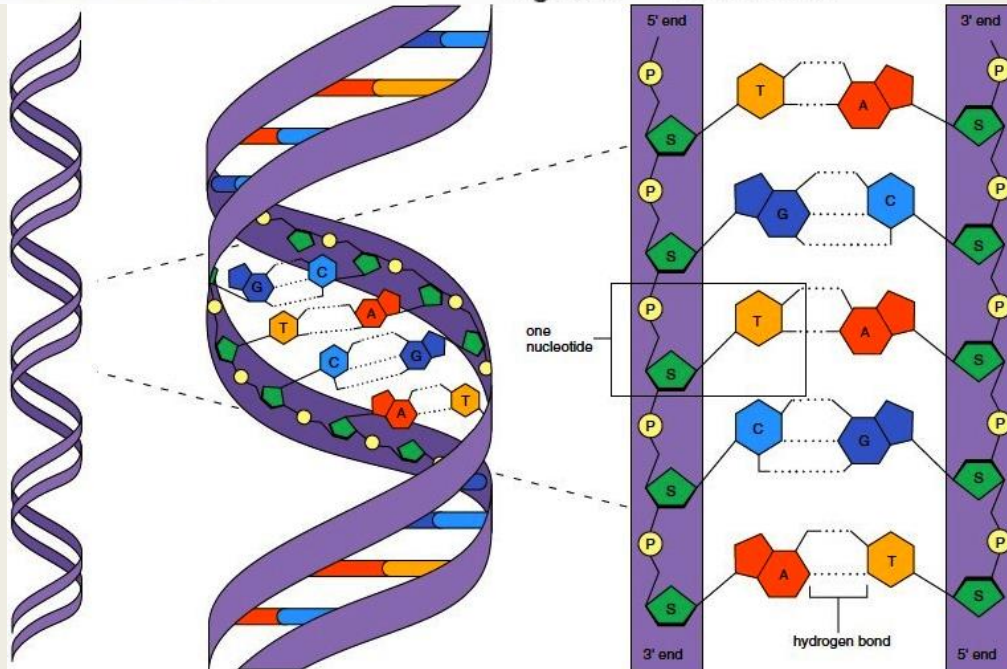


Figure 1

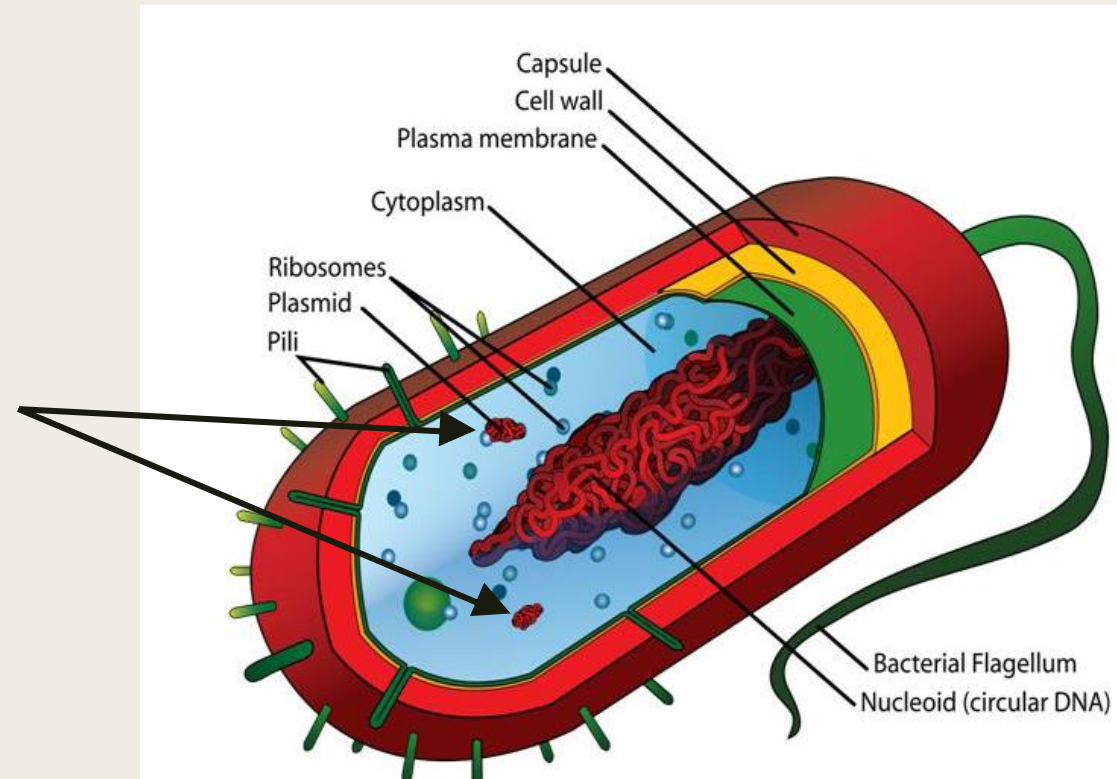


- Eukariotų DNR yra dvigrandė komplementarių poliribonukloetidų molekulė.
- Prokariotų DNR yra žiedinė dvigrandė molekulė.
- Plazmidė – prokariotų (bakterijų) žiedinė DNR.
- Dėl neigiamo krūvio, kurį suteikia fosfatų grupės, ląstelės branduolyje sukaupta DNR yra sujungta su baltymais.
- DNR ir baltymų kompleksai vadinami chromatinu.
- Iš chromatino formuojasi chromosomos.

DNR STRUKTŪRA PROKARIOTUOSE

BAKTERINĖS LĄSTELĖS SCHEMA

Plazmidės yra žiedinės nedidelės masės DNR molekulės, esančios už bakterijų nukleoido ribų.

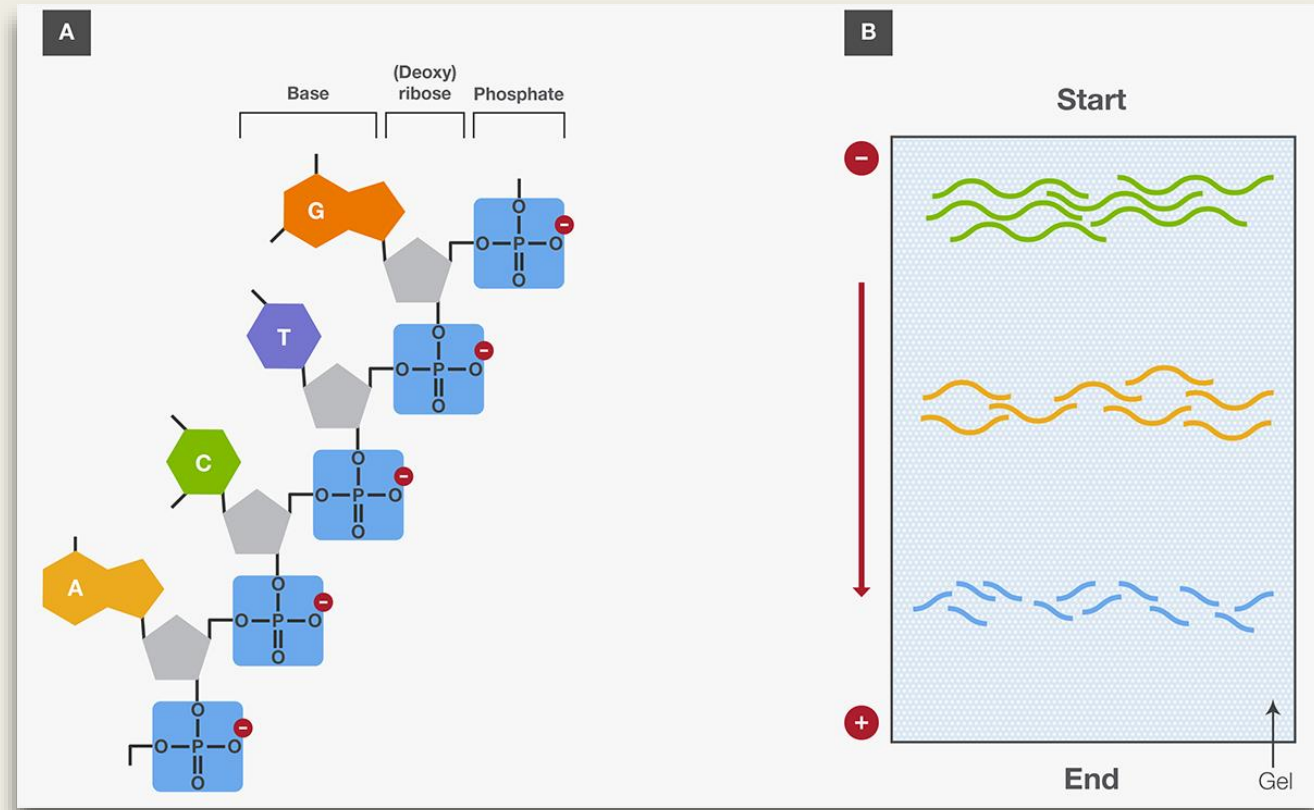


DNR TYRIMO ETAPAI

- DNR išgavimas
 - DNR išskyrimas
 - DNR gryninimas
 - DNR kokybės (dydžio, sekos) tyrimas
- DNR kokybės tyrimo metodai
 - Sekoskaita (sekvenavimas)
 - Elektroforezė**
 - Hibridizacija

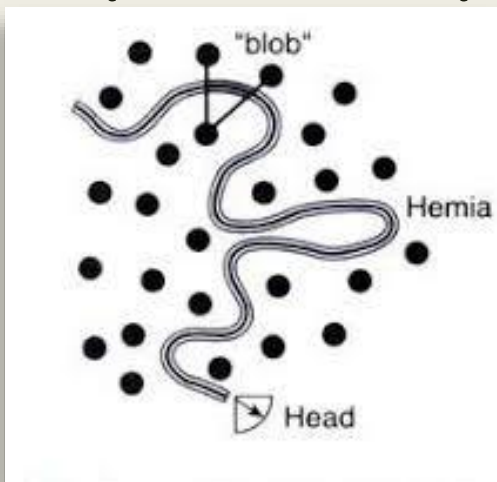
DNR elektroforezė

- Elektroforezė – krūvį turinčių (įkrautų) molekulių judėjimas elektriniame lauke.
- Priklauso nuo jų krūvio, dydžio ir konformacijos.
- Nukleorūgštys (NR) turi neigiamą krūvį, kurį lemia fosfatinės grupės. Todėl elektriniame lauke nukleorūgštys juda link anodo, molekulių judėjimo greitis šiuo atveju priklauso vien tik nuo NR dydžio.
- Elektroforezės metodu efektyviai galima atskirti molekules iki ~ 20 kb dydžio.
- Plačiai taikoma molekulinėje biologijoje, PGR produktų analizėje.



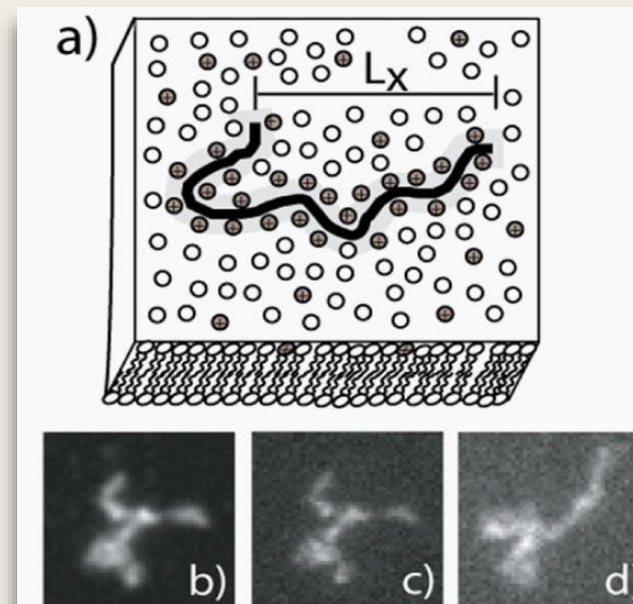
NR judėjimas elektriniame lauke

- NR gelyje juda “*biased reptation*” modeliu - molekulių migracija nukreipta link taikomos elektrinės jėgos ir juda “vinguriuodama”, pirmaujantis kraštas “tempia” likusių molekulių dalį.



<http://www.biologydiscussion.com/biochemistry/electrochemical-techniques/top-10-types-of-electrophoretic-techniques-used-in-biochemistry/12669>

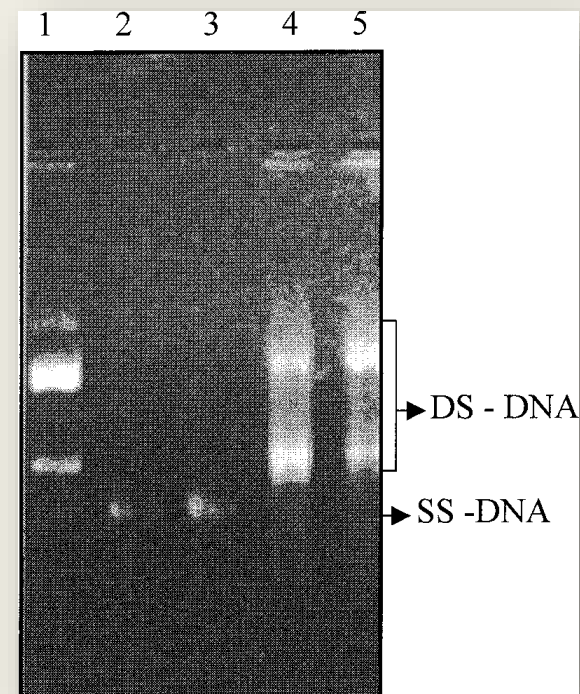
- Šis modelis taip pat buvo vizualizuotas fluorescencinės mikroskopijos pagalba.



https://www.softmatter.physik.uni-muenchen.de/raedler_group/supportedmembranes/conformational.jpg

DNR būseną elektroferezės metu

- Dažniausiai elektriniame lauke DNR juda ilgos lazdelės forma, tokiu atveju migracija priklauso nuo molekulės ilgio.
- Vienodo dydžio žiedinės formos DNR (plazmidės) gali dirstis gelyje ir dviem fragmentais, nes jų judėjimas elektriniame lauke priklauso, ar plazmidė yra išsivyniojusi ar labai stipriai kondensuota.
- Viengrandės DNR yra linkusios formuoti sudėtingas struktūras, tokių molekulių migravimas gelyje priklauso ne tik nuo dydžio, bet ir nuo tretinės struktūros. Tokiu atveju naudojamos tam tikros medžiagos, suardančios vandenilines jungtis (natrio naidroksidas, formamidas).



https://www.researchgate.net/profile/Umesh_Varshney2/publication/26882940/figure/fig1/AS:349586754424833@1460359385131/fig-2-Electrophoresis-of-the-reaction-aliquots-to-monitor-the-success-of-the-various.png

NR elektroforezėje naudojami geliai

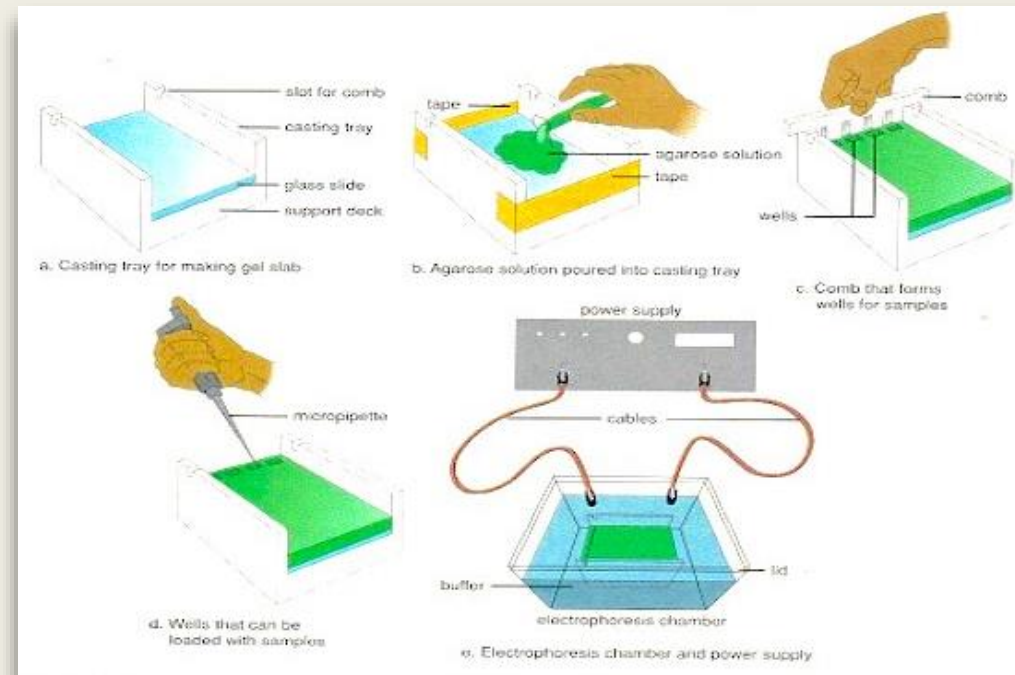
Agarozės

- Gaminama iš jūros dumblių;
- Dažniausia koncentracija 0,5 - 2 proc.;
- Naudojama DNR ir RNR atskyrimui;

Poliakrilamido

- Formuojamas vykstant reakcijai tarp akrilamido ir bis-akrilamido (*N,N'*-methylenebisacrylamide);
- Labai "tankus" gelis;
- Gali atskirti DNR fragmentus, kurie pagal ilgį skiriasi tik 0,2 proc.
- Lyginant su agarozės geliu, poliakrilamido geliu galima išgauti geresnės skiriamosios gebos rezultatus;

DNR elektroforezės klasikinė metodika



■ Buferiniai tirpalai

- TAE (*Tris/acetic acid/EDTA*);
- TBE (*Tris/Borate/EDTA*)
- 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM EDTA, 0.03% xylene cyanol FF, 0.15% Orange G, 60% glycerol (bus naudojamas greitoje DNR elektroforezės metodikoje)

■ DNR dažymas:

- Etidžio bromidas;
- SYBR Gold;
- SYBR Green I ir II;
- SYBR Safe;
- Eva Green;

- Molekulinės masės žymeklis;

Skirtingos koncentracijos agarozės gelių skiriamoji geba

Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution(kb = 1000)
0.5%	1 kb to 30 kb
0.7%	800 bp to 12 kb
1.0%	500 bp to 10 kb
1.2%	400 bp to 7 kb
1.5%	200 bp to 3 kb
2.0%	50 bp to 2 kb

<https://agctsequencing.files.wordpress.com/2012/02/tablegelpercent.jpg>

- **Etidžio bromido kiekis:** 0.2-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~ 2-3 μl 100 ml geliui);
- **Įtampa:** 5–10 V/cm (atstumas tarp elektrodų);
- **Laikas:** dominantis fragmentas nukeliauja 40–60 % gelio ilgio.

E-Gel® iBase™ Power sistema su E-Gel® Safe Imager™ realaus laiko transiluminatoriumi

- Ši kombinuota technologija atitinka ES saugaus darbo reikalavimus
- 1 – pilnos sistemos vaizdas



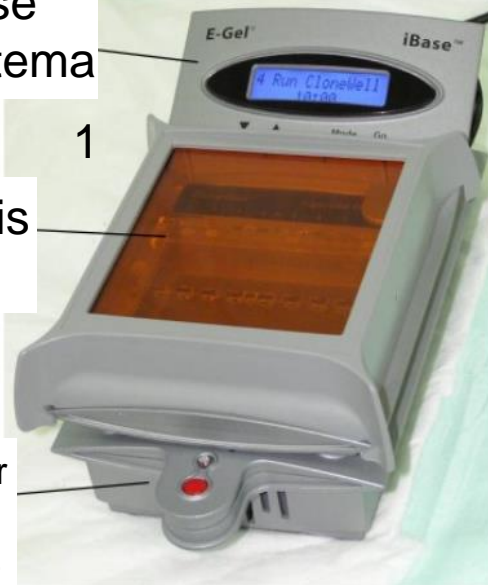
Slide cassette into electrodes

E-Gel iBase Power sistema

1

Apsauginis filtras

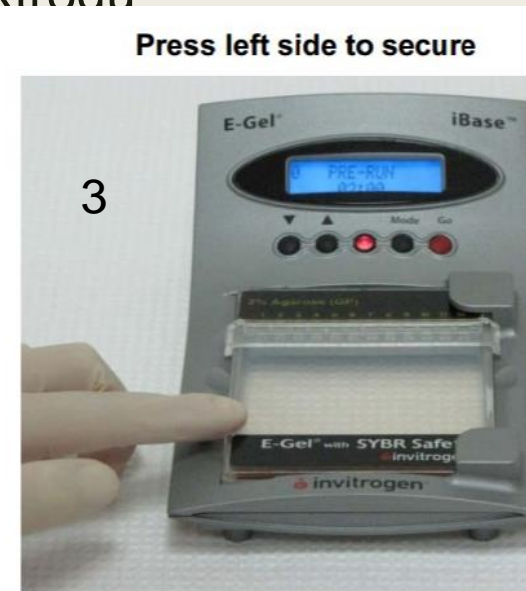
E-Gel Safe Imager realaus laiko transiluminatorius



2



3



Ko reikia darbui?

- Apsauginės pirštinės.
- E-Gel 0,8 proc. agarozės gelio plokštelė su 12 pavyzdžio šulinėlių. Gelyje yra etidžio bromido, kuris jungiasi su DNR.
- DNR preparatas: dvigrandė žiedinė plazmidė iš E.coli.
- Spektrofotometras: DNR preparato grynumui ir DNR kiekiu nustatyti (260 nm banga).
- Automatinės pipetės (10-100 mikrolitry; 2-20 mikrolitry; iki 1 ml).
- DNR standarto (DNA Ladder).
- DNR skiedimo buferinis tirpalas; 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 60 mM EDTA, 0,03% xylene cyanol FF, 0,15% Orange G, 60% glicerolis.
- Dejonizuotas vanduo.

DNR preparato paruošimas

- DNR grynumas ir koncentracija
- Plazmidžių preparato 5 mkl + 495 mkl vandens
- Matuojama SF pagal įvestą programą
- DNR preparatas elektroforezei
- 10 mkl plazmidžių+ 490 mkl vandens
- 10 mkl skiestų plazmidžių + 10 mkl DNR skiedimo buferinio tirpalo
- Užnešama į gelio šulinėlius

Pavyzdžio užnešimo tvarka

DNR standartas (10 ml buferio+10 ml standarto)

Tiriamieji pavyzdžiai

Tiriamieji pavyzdžiai



Vizualizacija ir skaičiavimai

