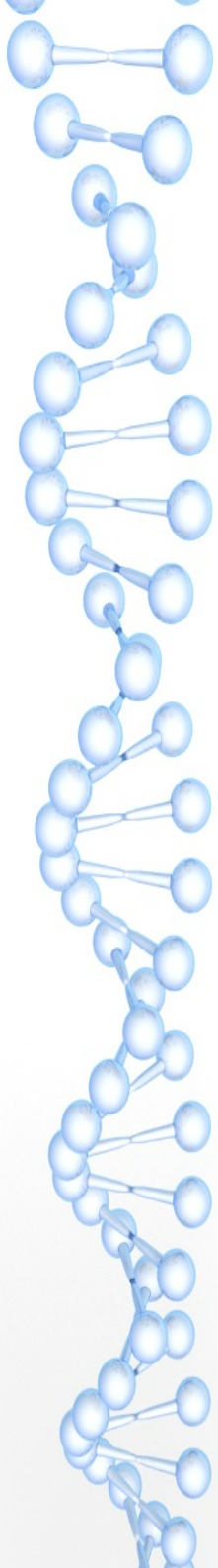


Elektroforeza DNA

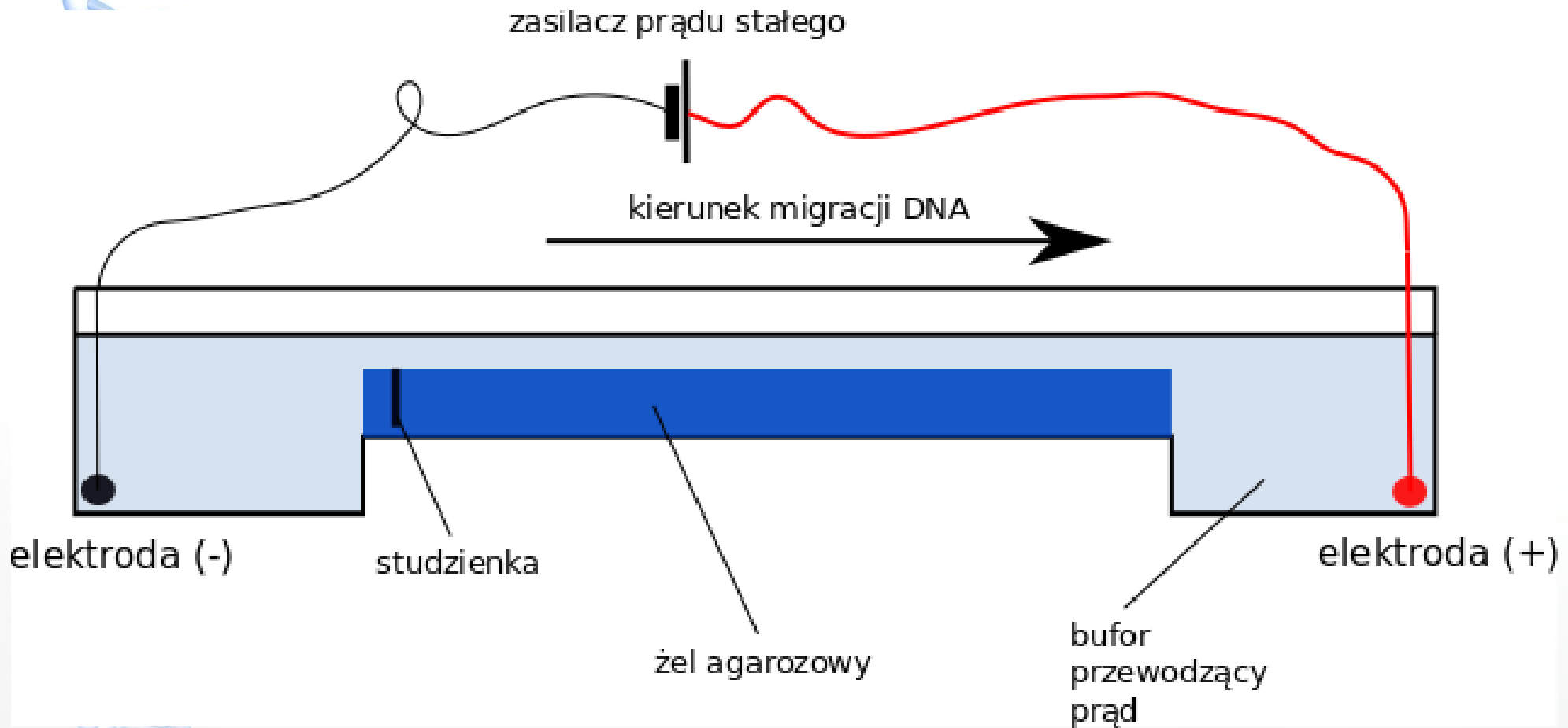


Elektroforeza – polega na przemieszczaniu się cząstek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym. Cząsteczki o ładunku dodatnim przemieszczają się w kierunku elektrody ujemnej, a cząsteczki o ładunku ujemnym w kierunku elektrody dodatniej.

Pozwala na rozdział cząsteczek DNA na podstawie ich długości.

DNA w obojętnym pH ma ładunek ujemny - przemieszcza się w kierunku elektrody dodatniej.

Elektroforeza pozioma



Agaroza

- polisacharyd otrzymywany z krasnorostów
- bardziej oczyszczona forma agaru
- po rozpuszczeniu w roztworze wodnym tworzy stały żel
- w zależności od długości rozdzielanych fragmentów DNA stosuje się różne stężenia agarozy (zazwyczaj od 0,5 % do 2 %)



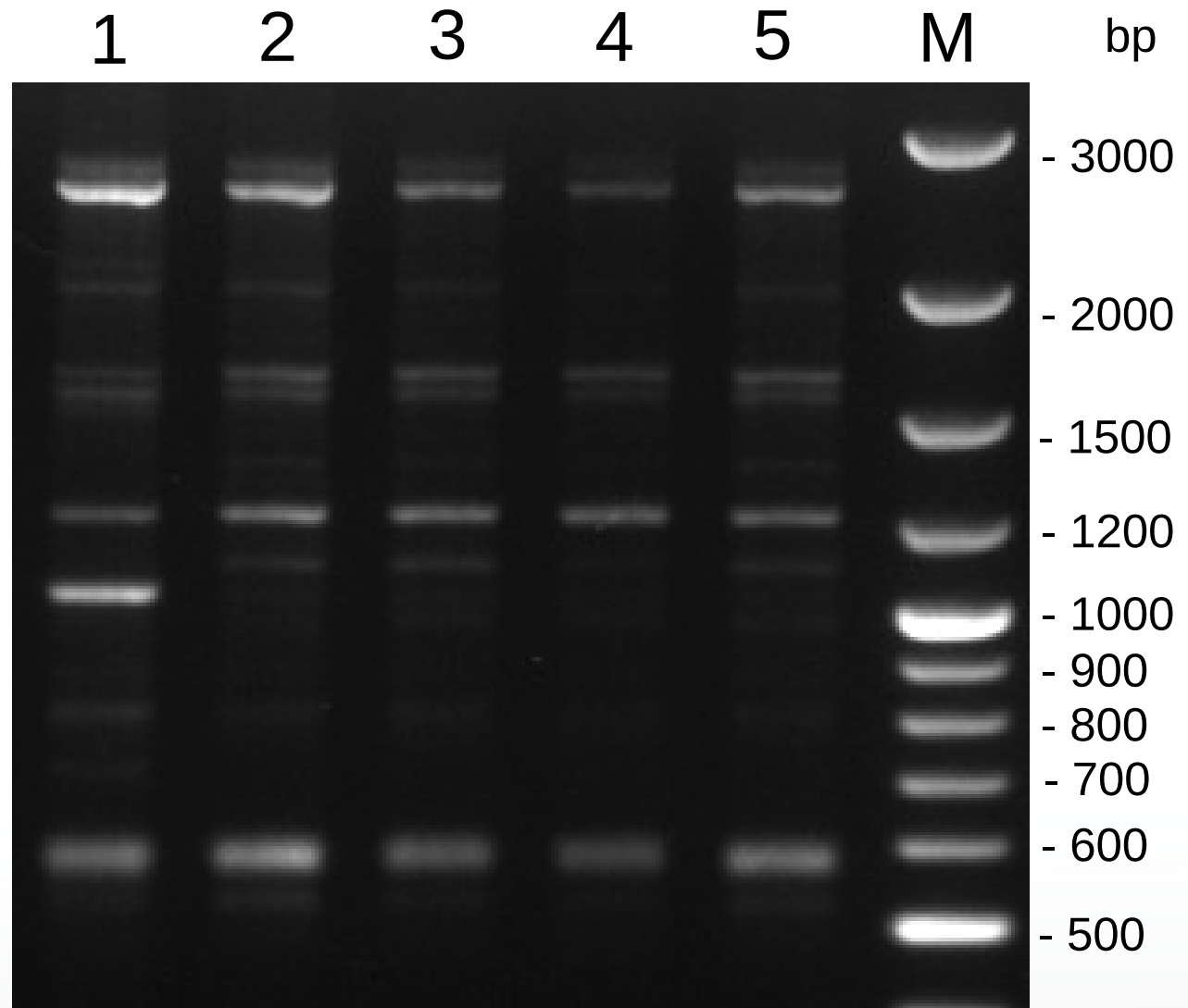
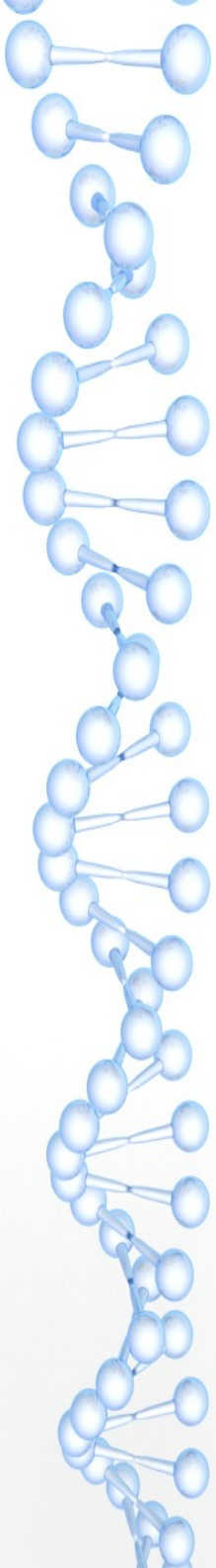
TBE vs. TAE

- TBE: tris, kwas borowy, EDTA
- TAE: tris, kwas octowy, EDTA
- TAE jest lepszy, gdy DNA po elektroforezie ma zostać użyte do reakcji enzymatycznych (borany są inhibitorami wielu enzymów)
- TBE jest lepszy do długich elektroforez (lepiej przewodzi prąd, mniej się nagrzewa)
- TAE jest lepszy do rozdziału długich fragmentów, a TBE krótkich (< 2kb)



Czynniki wpływające na mobilność cząsteczek:

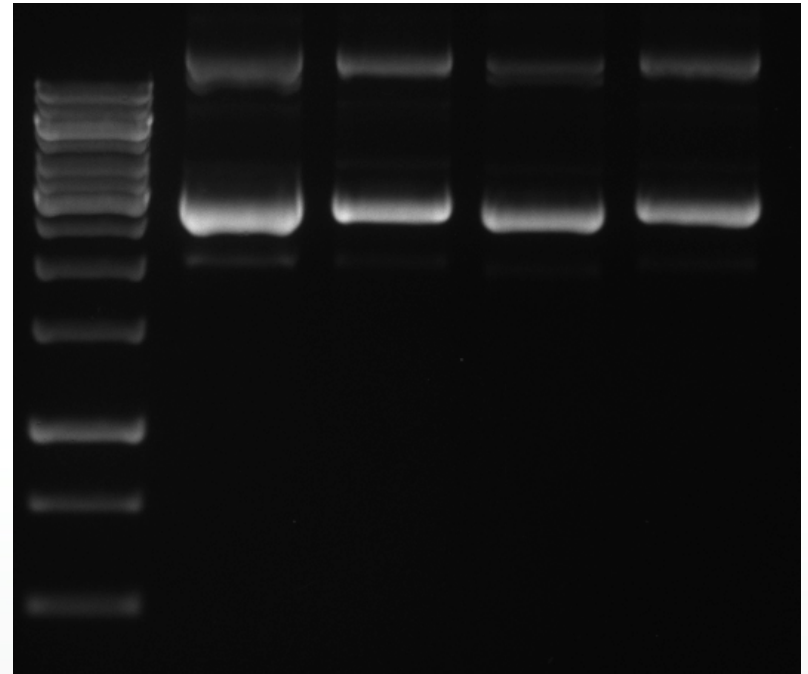
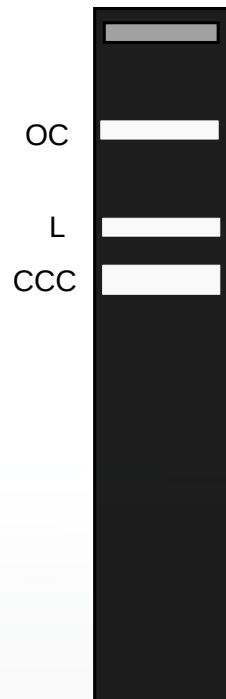
- wielkość cząsteczki
- (przebyta podczas elektroforezy odległość jest odwrotnie proporcjonalna do logarytmu długości fragmentu DNA)
- konformacja (kształt) cząsteczki
- stężenie żelu
- natężenie pola elektrycznego



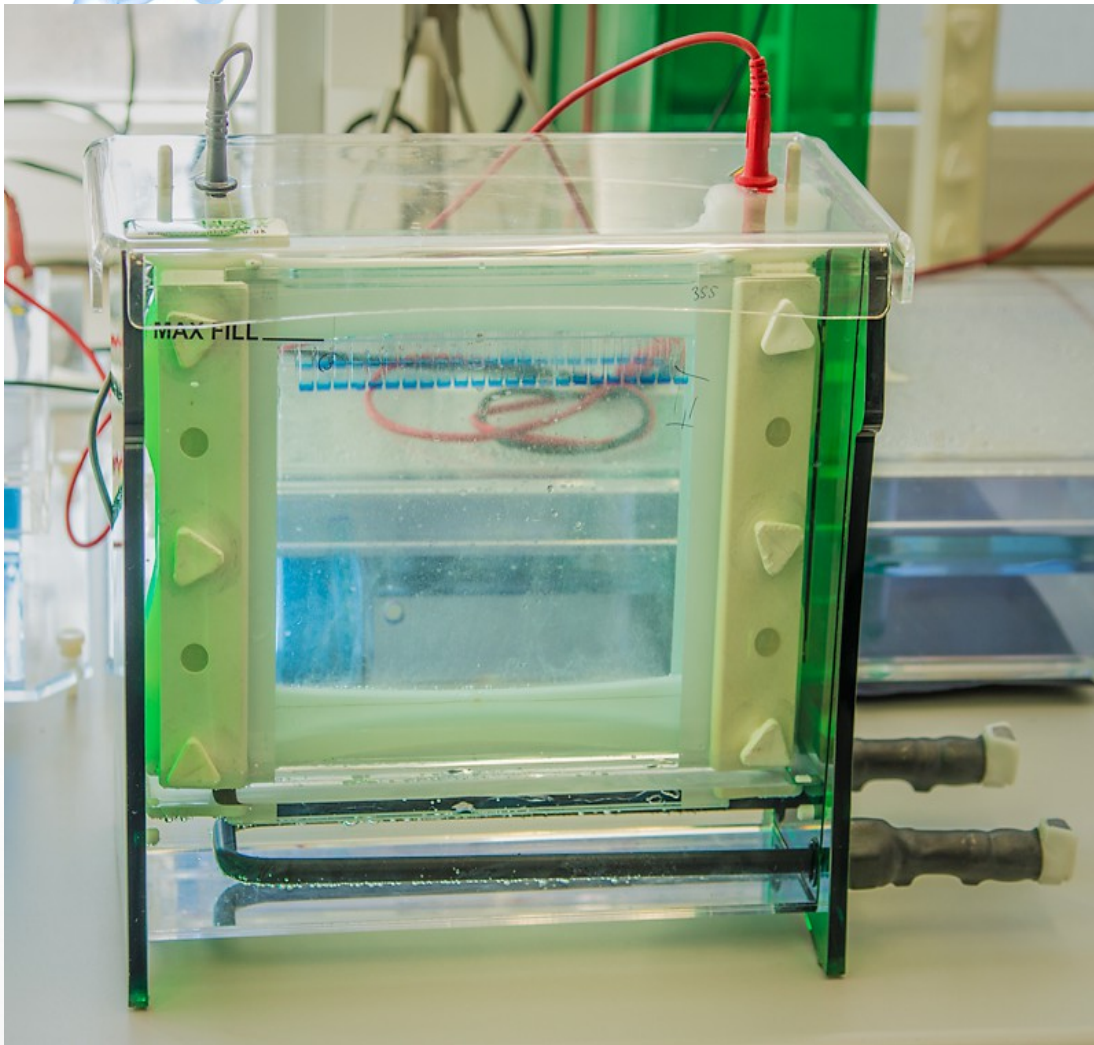
Plazmidy

3 formy:

- › CCC – superspiralna kolistka
- › OC – otwarta kolistka
- › L - liniowa



Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych



- polimer akrylamidu (akrylamid + bisakrylamid)
- duża zdolność rozdzielcza
- żele pływowe (elektroforeza pionowa)
- elektroforeza kapilarna



Analiza spektrofotometryczna DNA



Absorpcja UV

- maksimum absorpcji UV przez kwasy nukleinowe występuje przy długości fali 260 nm
- za absorpcję UV odpowiadają pierścienie aromatyczne zasad azotowych
- dwuniciowy DNA (dsDNA) charakteryzuje się niższą absorpcją przy 260 nm, niż jednoniciowy DNA (ssDNA) i RNA – ssDNA wykazuje ok. 40% wzrost absorpcji względem dsDNA
- powyższe właściwości pozwalają na określenie stężenia kwasów nukleinowych przy pomocy spektrofotometru



Ocena jakościowa

- maksimum absorpcji białek: 280 nm
- maksimum absorpcji zanieczyszczeń organicznych: <240 nm
- czystość preparatów kwasów nukleinowych określa się mierząc stosunek:
A260/A280 – dla zanieczyszczeń białkami
A260/A230 - dla zanieczyszczeń organicznych
- A260/280 powinien wynosić:
~1,8 dla DNA
~2 dla RNA
- A260/A230 powinien wynosić ~2