Gelová elektroforéza - úvod, demonstrační sada pro učitele

Kat. číslo 108.6411

PŘÍRUČKA PRO UČITELE S NÁVODEM PRO STUDENTY

CONATEX – DIDACTIC UČEBNÍ POMŮCKY s.r.o. – Velvarská 31 – 160 00 Praha 6
Tel.: 224 310 671 – Tel./Fax: 224 310 676
Email: conatex@conatex.cz – http: www.conatex.cz

Příručka pro učitele

Úvod do gelové elektroforézy

Shrnutí

Tuto příručku pro učitele je možné používat s Předváděcí sadou pro učitele (21-1147) i se Studentskou sadou pro 8 stanic (21-1148). Prostřednictvím Úvodu do gelové elektroforézy se studenti seznámí se základními principy separace makromolekul pomocí gelové elektroforézy. Tato technika přestavuje základní nástroj všech moderních molekulárních biologů. Studenti nebo učitel při demonstraci provedou lití agarózového gelu a zavedení známých a neznámých barviv s různou velikostí a nábojem molekul do gelových jamek. Poté do gelu přivedou elektrický proud a budou pozorovat, jak jednotlivá barviva prostupují matricí agarózového gelu. Následně se provede vyhodnocení a zápis migračních délek a elektrických nábojů barviv. Na závěr se na základě těchto údajů provede identifikace složek neznámých barviv.

Cíle

• Studenti se naučí základní principy gelové elektroforézy.
• Studenti se seznámí s univerzální technikou používanou v biotechnologických laboratořích.
• Studenti budou pozorovat, jak molekuly barviv různých velikostí a nábojů během elektroforézy migrují gelem a na základě této informace poté vypracují závěry o neznámých barvivech.

Podklady

Gelová elektroforéza je základní biotechnologická technika pro separaci makromolekul podle jejich velikosti a náboje. Tato metoda se často používá pro analýzy a manipulace se vzorky DNA, RNA nebo proteinů. Při této laboratorní práci se použije elektroforéza v agarózovém gelu pro oddělení a zjištění vlastností molekul barviv různých velikostí a nábojů.
V gelové elektroforéze se vzorky určené k separaci aplikují do média v podobě porézního gelu připraveného z materiálu jako například agaróza. Agaróza je čistá forma agaru, gelové látky extrahované z červených řas. Agarózový gel se připraví přidáním práškové agarózy do kapalného pufru a poté se směs vaří až do rozpuštění agarózy. Tato tekutá agaróza se poté zchladí na přibližně 55 - 60 °C, nalije se do gelové formy, nazývané nalévací vanička, a nechá se ztuhnout. Před ztuhnutím se do nalévací vaničky umístí formovací hřebínek, aby se vytvořila řada jamek, do kterých se zavedou vzorky po vyjmutí hřebínku ze ztuhlého gelu.
Nalévací vanička a ztuhlý gel se poté umístí do elektroforetické vany, která má na každé straně připojenou elektrodu. Gel se pokryje pufrem obsahujícím ionty, jako tris-boritan-EDTA (TBE), který reguluje pH systému a je elektricky vodivý. Následně se z gelu opatrně vyjme hřebínek a vzorky se zavedou do výsledných jamek v gelu pomocí pipety. Vzorky pro gelovou elektroforézu jsou smíchané s malým množstvím sacharózy nebo glycerolu, aby se zvýšila jejich hustota. To způsobí, že vzorky po zavedení klesnou na dno jamky.

Po zavedení všech vzorků do jamek v gelu se vana připojí ke zdroji elektrického napájení a do gelu se přivede elektrický proud (obvykle 50 - 150 V). Vana je konstruovaná s kladnou elektrodou (anodou) na jednom konci a zápornou elektrodou (katodou) na druhém konci. Elektroforéza doslova znamená "unášení elektřinou"; jakmile se vytvoří elektrické pole, nabité molekuly ve vzorcích začnou prostupovat póry v gelu k tomu pólu, který je přitahuje. Molekuly s výsledným záporným nábojem migrují směrem ke kladné elektrodě a molekuly s výsledným záporným nábojem putují směrem k záporné elektrodě. Celkový náboj molekul má vliv na rychlost prostupování gelem. Molekuly s velkým nábojem migrují gelem rychleji, než méně nabité molekuly.

Mobilita molekul během gelové elektroforézy také závisí na velikosti a tvaru molekul. Drobné póry gelové matrice se chovají jako síto, které zajišťuje rozlišení molekul. Malé molekuly se pohybují póry snadněji než velké molekuly, a proto prostupují relativně rychle. Velké molekuly čelí většímu odporu při jejich cestě drobnými póry gelu, a proto se pohybují pomaleji.

Velikost a náboj jsou faktory, které společně určují, jak rychle se budou molekuly pohybovat gelem, a tedy jakou vzdálenost urazí. Malá velikost a silný náboj znamená vyšší rychlost migrace gelem. Velká velikost a slabý náboj snižují rychlost migrace. (Pozn.: Při elektroforéze DNA, kdy mají všechny vzorky stejný náboj, je rychlost migrace založena pouze na velikosti).

Při této aktivitě bude elektroforéze v agarózovém gelu podrobeno pět známých vzorků barviv a tři neznámé vzorky. Některá z těchto barviv budou přitahována zápornou elektrodou a jiná kladnou elektrodou v závislosti na jejich celkovém náboji. Každý ze známých vzorků barviva vykazuje zcela jinou vzdálenost migrace v gelu v souvislosti s jejich velikostí a nábojem molekul. Studenti zjistí složky neznámých směsí barviv porovnáním migračních vzdáleností a směrů migrace neznámých vzorků s daty získanými o známých vzorcích barviva.

Poznámka: Elektroforéza barviv poskytuje jednoduchý a užitečný úvod do gelové elektroforézy. Přestože se určitým způsobem liší od většiny elektroforéz, se kterými se studenti později setkají, tyto rozdíly jsou stejně poučné, jako podobnosti jednotlivých metod. Například složky barviv jasně ilustrují, jak probíhá proces separace, zatímco DNA a proteinové gely je nutné obarvit, aby se ukázaly separované pruhy. Také to, že můžeme vidět specifické molekuly barviva, které urazily specifické vzdálenosti v gelu, později pomůže pochopit použití a princip nanášecího barviva při separaci DNA. Vytváření jamek uprostřed gelové hmoty a pozorování průchodu složek barviva různými směry podle jejich elektrického náboje později usnadní pochopení použití a chování SDS při obarvování proteinových vzorků pro eliminaci náboje jako potencionálního faktoru separace.

Materiály

Poskytnuté materiály jsou určené pouze pro použití s Předváděcí sadou pro učitele, nebo Studentskou sadou pro 8 stanic. Carolina Biological Supply Company odmítá veškerou odpovědnost za jakékoli jiné použití těchto materiálů.

Materiály obsažené v Předváděcí sadě pro učitele (21-1147)
1 lahev 0,8% rozpustné agarózy, 60 ml
(připraveno z 0,48 g agarózy v 60 ml 1×TBE)
1 lahev 20xTBE pufru, 20 ml
(dostatečné množství pro přípravu 400 ml 1 × roztoku TBE)
bromfenolová modř, 30 µL
metyloranž, 30 µL
ponceau G, 30 µL
xylen cyanol, 30 µL
pyronin Y, 30 µL
neznámý vzorek #1, 30 µL
neznámý vzorek #2, 30 µL
neznámý vzorek #3, 30 µL
8 pipet
1 měřítko
1 plastová miska

Potřebný materiál, ale neobsažený v Předváděcí sadě pro učitele (21-1147)
vana pro gelovou elektroforézu
zdroj elektrického napájení (nejméně 50-V)
role maskovací lepicí pásky
držák mikrozkumavek do mikrocentrifugy
400ml (nebo větší) nádoba
varná lázeň, nebo mikrovlnná trouba
destilovaná voda (380 ml)
vodní lázeň 55 – 60°C (volitelné)

Materiály obsažené ve Studentské sadě pro 8 stanic (21-1148)
agarózový prášek, 4 g
(pro přípravu 500 ml 0,8% roztoku agarózy)
1 lahev 20 x TBE pufru, 200 ml
(pro přípravu 4 L 1 × roztoku TBE)
bromfenolová modř, 500 µL
metyloranž, 500 µL
ponceau G, 500 µL
xylen cyanol, 500 µL
pyronin Y, 500 µL
neznámý vzorek #1, 500 µL
neznámý vzorek #2, 500 µL
neznámý vzorek #3, 500 µL
64 pipet
8 měřítek
8 plastových misek
Příručka pro učitele a návod pro studenty
(materiály ke kopírování jsou na konci této Příručky pro učitele)

Potřebný materiál, ale neobsažený ve Studentské sadě pro 8 stanic (21-1147)
8 van pro gelovou elektroforézu
8 zdrojů elektrického napájení (nejméně 50-V)
role maskovací lepicí pásky
držák mikrozkumavek do mikrocentrifugy
4 L (nebo větší) nádoba
1 L baňka, nebo kádinka
varná lázeň, nebo mikrovlnná trouba
destilovaná voda (3800 ml)
vodní lázeň 55 – 60°C (volitelné)

Časová náročnost

Příprava učitele

Potřebný čas	***Aktivita***
5 minut	Příprava 1×TBE pufru
5 minut	Odstředění nebo sklepnutí barevných činidel
10–25 minut	Příprava 0.8% roztoku agarózy

Laboratorní postup

Potřebný čas	***Aktivita***
*20 minut	Lití agarózového gelu
10–15 minut	Zavádění vzorků do gelu
15–25 minut	Elektroforéza
15 minut	Šetření a diskuse o výsledcích

*Gely je možné lít a skladovat v elektroforetické vaně, pokryté 1xTBE pufrem, po dobu 2 dnů před zavedením vzorků.

Tipy pro učitele

• Lití gelu můžete provést v jedné laboratorní lekci a uložit gel až na 2 dny v elektroforetické vaně, pokrytý 1×TBE pufrem, před zavedením vzorků barviv a provedením elektroforézy.
• složky neznámého vzorku barviva #3 mají časem tendenci se v roztoku usazovat. Z tohoto důvodu neznámý vzorek barviva #3 co nejtěsněji před použitím promíchejte vířením roztoku, nebo několikrát prsty ostře klepněte na dno zkumavky.
• Pokud používáte Studentskou sadu pro 8 stanic (21-1148), potom se o vzorky barviv musí jednotlivé laboratorní pracovní stanice ve třídě podělit.
• Doporučuje se provést elektroforézu gelů při napětí 100–150 V. Elektroforéza při tomto napětí bude trvat přibližně 15 až 25 minut. Gely je možné podrobit nižšímu napětí, ale celková doba elektroforézy bude delší. Gely by neměly být vystaveny napětí nižšímu než 50 V, protože pokud se budou vzorky separovat pomalu, potom dojde k jejich rozptýlení.
• Gel je nutné analyzovat ihned po elektroforéze. Nečekejte až do další laboratorní lekce. Časem se pruhy barviva rozptýlí a bude obtížné je rozlišit.
• Migrační vzdálenosti v neznámých vzorcích barviv nemusí přesně odpovídat svým protějškům mezi známými vzorky barviv (mohou se lišit o 1–2 mm). To je způsobeno vzájemným působením mezi různými typy barviv ve směsi při jejich procházení gelem. Takové vzájemné působení může někdy mírně ovlivnit konečnou migrační vzdálenost.

Bezpečnostní tipy

Pokud používáte Studentskou sadu pro 8 stanic (21-1148), připomeňte studentům, že musí vždy používat bezpečné laboratorní postupy. Pozorně na studenty dohlížejte, když připojují elektroforetickou vanu ke zdroji elektrického napájení. Zdroj napájení se nesmí zapnout dříve, než je víko vany bezpečně umístěno a elektrické vodiče jsou správně zapojeny do vstupů. Před sejmutím víka a odpojením těchto vodičů je nutné vypnout zdroj elektrického napájení.

Příprava

Příprava 1× TBE pufru
Tris-boritan-EDTA (TBE) je stabilní pufrový roztok, proto je možné ho připravit několik dnů dopředu a uložit ve skleněné baňce, nebo jiné nádobě při pokojové teplotě až do použití. Tento roztok připravíte následujícím způsobem:

Pro Předváděcí sadu pro učitele (21-1147)
Pro přípravu 1×koncentrace TBE přidejte 20 ml (celou lahev) 20×TBE pufru do 380 ml destilované vody v 400ml (nebo větší) nádobě. Vypláchněte veškeré zbytky z lahve, která obsahovala 20×TBE pufr, trochou čerstvě namíchaného pufru 1×TBE a vše přidejte do nádoby s 1×TBE. Míchejte až do úplného smíchání roztoku. Na nádobu nalepte štítek “1×TBE.”

Pro Studentskou sadu pro 8 stanic (21-1148):
Pro přípravu 1×koncentrace TBE přidejte 200 ml (celou lahev) 20×TBE pufru do 3800 ml destilované vody v 4 L (nebo větší) nádobě.

Vypláchněte veškeré zbytky z lahve, která obsahovala 20×TBE pufr, trochou čerstvě namíchaného pufru 1×TBE a vše přidejte do nádoby s 1×TBE. Míchejte až do úplného smíchání roztoku. Na nádobu nalepte štítek "1×TBE."

Odstředění nebo sklepnutí barevných činidel

Činidla se během přepravy často rozprostřou okolo stěny nebo víčka zkumavky, ve které jsou skladována. Z tohoto důvodu je před vytvořením pracovních stanic nutné vzorky barviv dostat na dno jejich skladovacích zkumavek s použitím jedné z níže uvedených metod. Zkumavky obsahující vzorky barviv je možné odstředit, nebo sklepnout několik dnů před laboratorní lekcí a uložit ve vzpřímené pozici do držáku na mikrozkumavky.

1. Zkumavky s barvivy na krátkou dobu (~ 30 s) roztočte v mikrocentrifuze pro 1,5 ml zkumavky.
2. Ostře poklepte na dno každé zkumavky o desku stolu, až veškerá kapalina steče na dno zkumavky.

Příprava 0,8% roztoku agarózy

Pozor: Při manipulaci s 0,8% roztokem agarózy použijte kuchyňské chňapky nebo žáruvzdorné rukavice.

Připravte 0,8% roztok agarózy nejméně 30 minut před litím gelu.

Pro Předváděcí sadu pro učitele (21-1147)

Rozpusťte agarózu ohřátím lahve jedním z následujících způsobů:

1. Uvolněte víčko lahve s 0,8% agarózou. Lahev ohřívejte v mikrovlnné troubě na vysoký výkon v minutových intervalech, dokud se agaróza úplně nerozpustí. Po každé minutě ohřívání láhev protřepejte, abyste zabránili překypění agarózy. Pozorně lahev pozorujte. Pokud se agaróza začne vařit příliš divoce, opatrně ji vyjměte ze zdroje tepla a počkejte, až se kapalina usadí. Poté pokračujte v zahřívání, je-li to potřeba.
2. Uvolněte víčko lahve s 0,8% agarózou. Ohřívejte lahev ve varné lázni až do úplného rozpuštění agarózy (přibližně 6 až 12 minut). Hladina vody musí být právě nad hladinou agarózy v lahvi. Po pár minutách ohřívání láhev vždy protřepejte, abyste zabránili překypění agarózy. Pozorně lahev pozorujte. Pokud se agaróza vaří příliš divoce, opatrně ji vyjměte ze zdroje tepla a počkejte, až se kapalina usadí. Poté pokračujte v zahřívání, je-li to potřeba.

Rozpouštěním agarózy se 0,8% agarózový roztok stává čirým. Protřepejte lahev a pozorujte její dno, abyste se ujistili, že na dně nezůstává nerozpuštěná agaróza. Nechte lahev zchladnout, dokud ji nebudete moci držet holou rukou bez pocitu pálení. Stále by měla být teplá okolo 55 až 60°C. V tuto chvíli můžete agarózu hned použít, nebo ji udržovat na teplotě 55 až 60°C ve vodní lázni, dokud nebudete připraveni ji použít.