

## Agaróz gél elektroforézis

A DNS fragmentek elválasztására, identifikálására és a fragmentek tisztítására legáltalánosabban használt módszer az agaróz gél elektroforézis. A technika egyszerű, gyors és a gélben lévő DNS közvetlenül láthatóvá tehető: a DNS csíkok a gélben festhetők kis koncentrációjú interkaláló festékekkel, az ethidium-bromiddal; már 1 ng DNS látható a gélen UV fényben.

A DNS elektroforetikus vándorlási sebessége az agaróz gélben 4 fő paramétertől függ:

### A DNS molekula mérete:

A lineáris kettős szálú DNS (amely feltehetően egyik végével előrefele vándorol a gél mátrixban) sebessége fordítottan arányos a molekulásúly tizedes alapú logaritmusával.

### Az agaróz koncentrációja:

A DNS elektroforetikus mobilitásának ( $\mu$ ) a logaritmus és a gélkoncentráció ( $\tau$ ) között egyenes arányosság van, amely a következő egyenlettel írható le:

$$\log m = \log m_0 - K_r \tau$$

ahol  $\mu_0$  a szabad elektroforetikus mobilitás,  $K_r$  pedig a retenció együttható, amely függ a gél tulajdonságaitól és a vándorló molekula méretétől, valamint alakjától.

### A DNS koformációja:

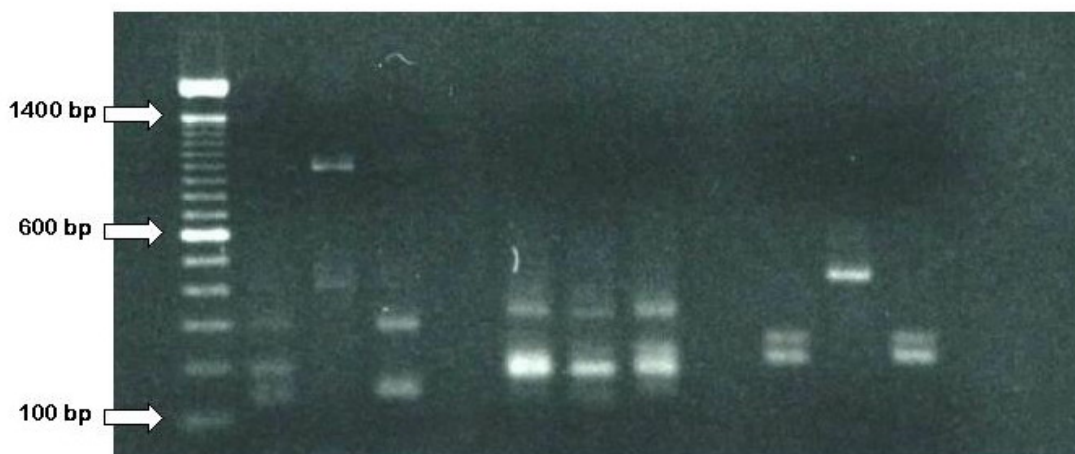
Az azonos molekulásúlyú zárt cirkuláris (I. forma), nicked cirkuláris (II. forma) és a lineáris (III. forma) DNS különböző sebességgel vándorol az agaróz gélben. A három forma relatív mobilitása elsősorban az agaróz koncentrációjától függ, de hat rá az áramerősség, a puffer ionerőssége és az I. formán levő szuperhelikus menetek sűrűsége. Bizonyos körülmények között az I. forma gyorsabban vándorol, mint a II. forma, máskor a sorrend fordított. Ebben az esetben egyre nagyobb mennyiségű ethidium-bromid kötődik a DNS-hez, az I. forma negatívan csavarodott szuperspiráljai kitekerednek és a molekula vándorlási sebessége csökken. Egy bizonyos kritikus szabad festék koncentrációnál ahol a molekula teljesen kiegyenesedik, a DNS I. formájának vándorlási sebessége eléri a minimumot.

### Az alkalmazott áram:

Alacsony feszültségen a lineáris DNS vándorlása arányos a feszültséggel.

### A DNS bázisösszetétele és a hőmérséklet:

A DNS viselkedése az agaróz gélben nem függ lényegesen sem a DNS bázisösszetételétől, sem a hőmérséklettől.



1. ábra: Az agaróz géltre felvitt minták felülről lefelé futottak, bal szélén létra látható.

## Gyakorlat leírása:

A DNS molekulákat rendszerint 0,5–1,5% agaróz gélben választjuk el és vizsgáljuk, 3–5 V/cm térerő mellett.

Agaróz gél készítése:

- 0,4/0,5 g agaróz
- 1 ml 50x TAE puffer (2,0 M Tris–acetát, 0,05 M EDTA, pH 8,0)
- 49 ml deszt. víz
- melegítéssel feloldva.

### 1. Etídium-bromidos módszer:

A DNS láthatóvá tétele céljából a gélhez etídium–bromidot adunk. Az etídium–bromid hozzákötődik a DNS–hez és UV fényben fluoreszkál. **Vigyázat az etídium–bromid erősen mutagén!**

Amikor a gél lehűlt kb. 60°C–ra beleteszünk 10 µl etídium–bromidot. Ezután az oldatot beleöntjük az előkészített tálkába és beleállítjuk a fésűt.

A gél megszilárdulása után a fésűt óvatosan kihúzzuk. A zsebek sérülésének megakadályozásához a zsebek környékén a gél felületére 1×TAE oldatot csepegtetünk.

A mintákhoz hozzáadunk 5 µl STOP–keveréket (50% szacharóz, 20 mM Na–EDTA, 0,1% brómfenolkék), majd óvatosan 7 µl-t bepipettázzuk a gélen lévő zsebekbe, a puffer alá rétegezve. A minták mellé standardként 7 µl DNS létrát vagy *HindIII*–mal emésztett λ DNS–t viszünk fel.

A gélt a futtatókádba helyezzük és feltöltjük pufferrel (kb. 600 ml 1×TAE). Bekapcsoljuk a tápegységet ügyelve a polaritásra (a DNS a pozitív sarok felé vándorol). A mintákat 70 V feszültségen 1–1,5 órát futtatjuk. A brómfenolkék elhelyezkedése tájékoztató információt ad az elektroforézis állásáról.

Az elektroforézis befejezése után a gélt UV lámpa alatt vizsgáljuk.

## 2. Előhívás gyors festési eljárással:

A melegítéssel feloldott agaróz gélt beleöntjük az előkészített tálkába és beleállítjuk a fésűt. A gél megszilárdulása után a fésűt óvatosan kihúzzuk. A zsebek sérülésének megakadályozásához a zsebek környékén a gél felületére 1×TAE oldatot csepegtetünk. A mintákhoz hozzáadunk 2 µl „sample loading dye”-t, majd óvatosan 7 µl-t bepipettázunk a gélen lévő zsebekbe, a puffer alá rétegezve. A minták mellé standardként 7 µl DNS létrát vagy *HindIII*-mal emésztett λ DNS-t viszünk fel.

A gélt a futtatókádba helyezzük és feltöltjük pufferrel (kb. 600 ml 1×TAE). Bekapcsoljuk a tápegységet ügyelve a polarításra (a DNS a pozitív sarok felé vándorol). A mintákat 100 V feszültségen 0,5-1 órát futtatjuk.

A „sample loading dye” (Biorad) két kék festéket tartalmaz, amelyek nem festik meg magát a DNS-t, de megkönnyítik a zsebek megtöltését és segítik az elektroforézis állásának nyomon követését. A „gyorsabb” festék a körülbelül 500 bp méretű, a „lassabb” a körülbelül 5 kb méretű DNS fragmentekkel vándorol együtt.

A futtatás után a DNS fragmentek elhelyezkedését festési eljárás segítségével vizsgáljuk. A festésre kétféle módszer van:

### 1) Gyors festés (12-15 perc)

- a) A műanyag festő tálkába 100-120 ml **100**´ „Fast Blast” (Biorad) festéket öntünk.
- b) A gélt 2 percig (de nem több, mint 3 percig) festjük enyhe rázogatás közben. (Vigyázat, a gél könnyen elszakad!) A festék oldat legalább további 7 gél megfestésére felhasználható.
- c) A gélt egy nagyobb edénybe tesszük és 500-700 ml 40-55 °C-os vízzel mossuk kb. 10 másodpercig enyhe rázogatással.
- d) Újabb 500-700 ml meleg vízzel mossuk a gélt 5 percig rázatás közben.
- e) Megismételjük a d) pontot.
- f) A gél vizsgálható. A vonalak 5-15 perc várakozás után élesebbé válhatnak. Esetlegesen újabb mosásokra lehet szükség.

### 2) Festés egy éjszakán keresztül (min. 8 h)

- a) A műanyag festő tálkába 100-120 ml **1**´ „Fast Blast” (Biorad) festéket öntünk.
- b) A gélt egész éjszakán át áztatjuk.
- c) A gél ezután azonnal vizsgálható.

A gélt világos háttér előtt vizsgáljuk. Egy műanyag lapot a géltre helyezve a mintákat átmásoljuk vagy a gélt lefotózzuk.

Standardok:

A *HindIII*-mal emésztett | DNS fragmentek mérete:

23130 bp  
9416  
6557  
4361  
2322  
2027  
564  
125

DNS létra, 1 kb (Sigma, Product No. D0428)

Konc.: 0,50 µg/µl

Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

0,1 mM EDTA

Az elektroforézishez felhasználandó:

2 µl DNS létra,

48 µl víz,

12,5 µl Stop keverék összetételben.

A DNS létra fragmentjeinek mérete:

10.0 kb  
8.0  
6.0  
5.0  
4.0  
3.0  
2.5  
2.0  
1.5  
1.0  
0.5