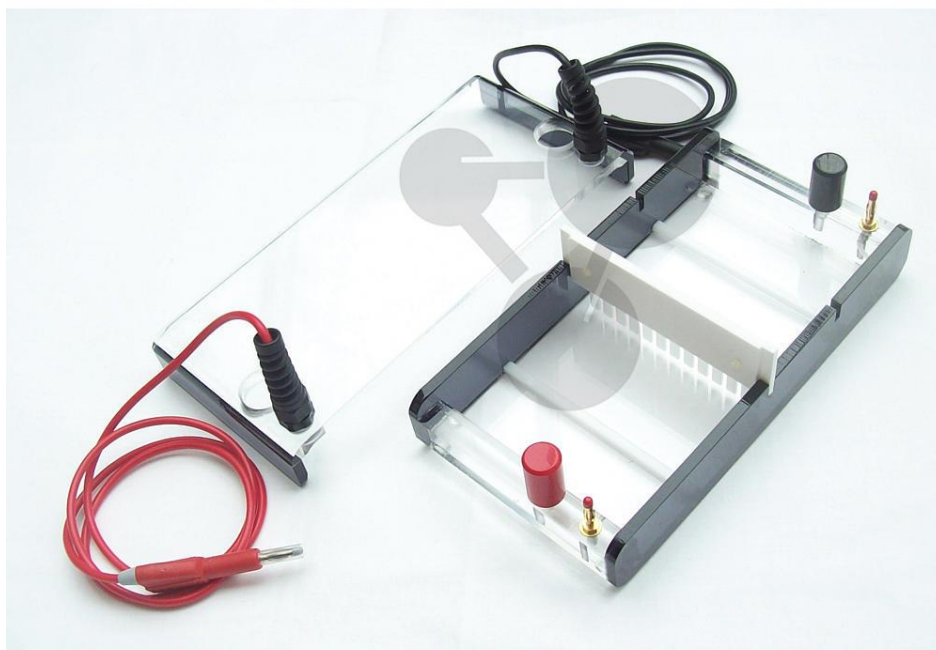


Výuková elektroforéza, žákovská souprava
Obj. č. 1103112



Prohlášení o shodě

Elektroforézní komora odpovídá bezpečnostním požadavkům podle EN 50081-1 (1992) a EN 50082-01 (1992).

Obsah

| | |
|--|--|
| Rozsah dodávky | 2 |
| Bezpečnostní pokyny | 2 |
| Technické parametry | 3 |
| Záruka..... | 3 |
| Obecné pokyny pro obsluhu | 3 |
| Nalévání agarózových gelů | 3 |
| Osazení agarózového gelu a elektroforéza..... | 4 |
| Barvení nukleových kyselin | 5 |
| Vyhodnocení / dokumentace | 5 |
| Pokyny pro čištění a ošetřování | 5 |
| Potřebné materiály a receptury | 5 |
| Elektroforézní ústojný roztok (pufr) | 5 |
| Agaróza, objem gelu a jeho koncentrace | 6 |
| Plnicí ústojný roztok/ústojný roztok vzorku..... | 6 |
| Délkové standardy DNA | 7 |
| Barvení nukleových kyselin | 7 |
| Problémy: příčiny a jejich odstranění | 7 |
| Prohlášení o shodě..... | Chyba! Záložka není definována. |
| Literatura..... | Chyba! Záložka není definována. |

Rozsah dodávky

- Elektroforézní komora s korozivzdornými platinovými elektrodami a kvalitními přípojkami kladného a záporného pólu.
- Bezpečnostní víko s pevně přišroubovanými elektrickými kabely.
- Dva gelové hřebeny, tloušťka 1,5 mm, po 12 zubech.
- Podrobný návod k použití.

Bezpečnostní pokyny

- Před prvním použitím elektroforézní komory si pozorně přečtěte tento návod k použití.
- Pro elektrické napájení používejte výhradně stejnosměrné síťové adaptéry (Power Supplies) odpovídající podmínkám CE, například katalogové číslo 530.210 Power Supply MS Mini 300 V, 400 mA, 2 výstupy, nebo katalogové číslo 530.215 Power Supply MP 300 V, 700 mA, 150 W, 4 výstupy firmy Schlüter Biologie, Jörk Klawun.
- Před sejmutím bezpečnostního víka je bezpodmínečně nutné odpojit elektroforézní komoru od napájení.
- Víko nikdy nepokládejte na vlhký povrch.
- Pokud není elektroforézní komora používána, musí být odpojená od síťového adaptéru.
- Nepřekračovat maximální proud a napětí komory (150 mA, 120 V, 20 W).
- Nesmí být překročena maximální výška naplnění ústojným roztokem (pufr).

Technické parametry

V případě horizontální elektroforézní komory se jedná o zařízení, u kterého je gel naléván přímo do komory, a sice do prostoru, který je na dnu komory ohraničen bílými plastovými lištami.

Gelová komora má dno propouštějící UV záření, při osvětlení komory zdola UV světlem je tak možné sledovat průběh elektroforézy, podmínkou je přítomnost odpovídajících barviv v gelu nebo ústojném roztoku. Takto je možno snadno a pohodlně dokumentovat i mezivýsledky procesu oddělování. Bez nutnosti vyjmutí gelu z komory je možno dokumentovat i konečný výsledek elektroforézního oddělení.

Samozřejmě je ale možné gel i vyjmout a zdokumentovat výsledky, případně provést jeho obarvení.

Pro výše uvedené pozorování používejte pouze UV světlo s vlnovou délkou nad 300 nm. Tvrdé UV světlo (< 300 nm) poškozuje jak gelovou komoru, tak i nukleové kyseliny. Posledně uvedená skutečnost může být krajně nežádoucí ve vztahu k navazujícím experimentům.

Pokud potřebujete pro separaci pouze krátké úseky, můžete využít obě pozice pro hřeben. Budete tak mít pro vzorek k dispozici 24 oddílů namísto 12.

Záruka

Výrobce přístroje ručí za to, že byla dodaná elektroforézní komora řádně vyzkoušena a že odpovídá platným bezpečnostním standardům.

Přesto však bezprostředně po doručení zkontrolujte, zda je dodávka kompletní a zda nedošlo k jejímu poškození při přepravě. Uschovejte přepravní obal minimálně do okamžiku úplného vyzkoušení přístroje. Tím si usnadníte zpětné zaslání v případě zjištění poškození.

Na elektroforézní komoru poskytuje výrobce záruku v délce 24 měsíců, podmínkou je její používání výhradně v souladu s návodem k použití. Nárok na bezplatnou výměnu nebo opravu zaniká, pokud byl přístroj používán nesprávně. Je vyloučeno ručení za následné škody, ke kterým dojde při použití elektroforézní komory.

Dvě platinové elektrody vydrží podle zkušeností při správném použití mnoho let. K poškození dochází většinou mechanickým zásahem (kartáčem při čištění) nebo kontaktem s tzv. „jedy pro platinu“ jako je fosfor, bor nebo těžké kovy jako olovo, zinek, cín, atd. Z tohoto důvodu se na platinové elektrody nevztahuje záruka na přístroj.

Platinové elektrody nebo jiné závady elektroforézní komory opravujeme cenově výhodně i po skončení záruční lhůty.

V zájmu urychlení technického vývoje si výrobce vyhrazuje právo provádět změny technických nebo vzhledových detailů i bez předchozího upozornění.

Obecné pokyny pro obsluhu

Nalévání agarózových gelů

1. Při zahřívání roztoků agarózových gelů používejte ochranný oděv, ochranný brýle a izolované rukavice.
2. Bezpečnostní víko snímejte z přístroje tak, že jednou rukou přidržíte spodní díl elektroforézní komory a druhou rukou pomalu stáhnete víko směrem nahoru.
3. Pro přípravu gelových roztoků smí být použity pouze vhodné agarózy a odpovídající elektroforézní ústojné roztoky. Druh a koncentrace agarózy a ústojného roztoku závisí na druhu a délce separovaných nukleových kyselin. Při přípravě roztoku agarózy je nutno odvážit odpovídající množství agarózy do malé Erlenmeyerovy baňky, poté přidat vypočtené množství ústojného roztoku (například 480 mg agarózy + 40 ml ústojného

roztoku s jednonásobnou koncentrací u 1,2% gelu) a míchací tyčinku (zahřívání pomocí magnetického míchadla s ohřevem). Je nutno zjistit celkovou hmotnost naplněné Erlenmeyerovy baňky, aby bylo možné následně nahradit ztráty odparem při ohřevu přidáním H₂O (destilované). Tak bude mít kapalný roztok gelu, který bude následně nalit do přístroje, požadovanou koncentrací agarózy. Při rozpouštění agarózy zahřívát Erlenmeyerovu baňku buď v mikrovlnné troubě, nebo na topné desce míchadla s nastaveným středním stupněm výkonu, a to tak dlouho, až nebudou v protisvětle vidět žádné částice. Ohřev v mikrovlnné troubě je nutno provádět vždy krátkým zapnutím při středním stupni výkonu – opakovat 2 – 3x. Mezi jednotlivými ohřevy je nutno Erlenmeyerovu baňku vždy vyjmout (pozor: používat rukavice a ochranné brýle, pamatovat na to, že var může nastat s určitým zpožděním!) a krouživým kýváním opatrně promíchat její obsah. Poté vložit baňku zpět do mikrovlnné trouby a celý proces opakovat až do úplného rozpuštění agarózy.

4. Aby bylo zabráněno deformaci elektroforézní komory při příliš vysoké teplotě, musí roztok gelu před nalitím vychladnout na teplotu 55°C a méně. Poté je nutno gel nalít bez bublinek do prostoru mezi oběma bílými plastovými proužky na dnu komory (objem je zhruba 40 ml). Poté vložit jeden nebo dva hřebeny. I při tomto úkonu je nutno dbát na to, aby nebyly v gelu vzduchové bubliny. U gelů ze standardní agarózy dojde za pokojové teploty ke ztuhnutí do cca 20 minut. Je však nutno nechat je uložené za pokojové teploty ještě minimálně dalších 40 minut, aby došlo k jejich optimálnímu ztuhnutí (tip: velice dobrých výsledků je možné dosáhnout při uložení do chladničky po dobu 15 – 20 minut při teplotě cca 8°C). Pokud budete používat „Low Melting“ nebo jiné speciální agarózy, postupujte podle pokynů jejich výrobce.
5. Následně je nutno překrýt gel vrstvou ústojného roztoku s tloušťkou cca 3 – 4 mm. Gel je možné po opatrném odstranění hřebenu ihned osadit vzorky. Překrývaný gel je možné uchovávat po několik dnů, přitom je vhodné ponechat vložený hřeben. Gel je však nutno chránit před vysycháním, například zakrytím kuchyňskou fólií.

Osazení agarózového gelu vzorky a elektroforéza

1. Po úplném ztuhnutí agarózového gelu je nutno na něj nalít ústojný roztok tak, aby byl gel překryt tímto roztokem v celé ploše v tloušťce cca 3 – 4 mm. Maximální množství ústojného roztoku je vyznačeno značkou „Fill Line“. Komora musí stát ve vodorovné poloze na rovném pracovním stole (toto případě zkontrolovat pomocí vodováhy), aby bylo zabráněno různé tloušťce překrytí.
2. Opatrně vyjměte z agarózového gelu hřeben (nejdříve s ním zakolíbejte sem a tam a poté jej vytáhněte rovně nahoru).
3. Nyní naneste do vytvořených kapsiček v gelu připravené vzorky. Vzorky musí být předem smíchány s odpovídajícím ústojným roztokem tak, aby došlo ke zvýšení jejich specifické hmotnosti a vzorky při nanášení mikropipetou klesly do kapsiček (viz kapitolu ústojný roztok pro vzorky).
4. Při plnění gelových kapsiček podržet mikropipetu nad kapsičkou nebo ji do ní opatrně ponořit a opatrně vytlačit vzorek. Přitom nesmí dojít k poškození dna kapsičky. Tento postup by měli začátečníci nacvičit na „cvičných vzorcích“ tvořených pouze H₂O a ústojným roztokem.
5. Na gel by měl být rovněž vždy uložen minimálně jeden délkový standard, aby bylo možné provést stanovení velikosti respektive kontrolu očekávané velikosti fragmentů.
6. Nyní nasadte na elektroforézní komoru bezpečnostní víko a připojte konektor k vhodnému zdroji stejnosměrného napětí (Power Supply). Přitom dbejte na správnou polaritu, Nukleové kyseliny mají v zásaditém až neutrálním prostředí záporný náboj a migrují k anodě, kladné elektrodě (označena červeně).
7. Zapněte zdroj napětí a proveďte při přiměřeném napětí (doporučené napětí: 60 až 70 V) elektroforézní oddělení. Vlivem elektrického odporu dohází k zahřívání agarózového

gelu, ústojného roztoku a komory. Toto zahřívání je v určitých mezích normální a je závislé na řadě faktorů (iontový náboj, výška náplně v komoře, atd.). Toto zahřívání by však nemělo ovlivňovat separační vlastnosti agarózové matrice. Normálně zůstává gel na teplotě 28°C až „na dotek teplý“. Průběh elektroforézy je možno sledovat prostřednictvím migrace barviva obsaženého v ústojné kapalině vzorku.

Často je v této ústojné kapalině používána jako barvivo bromfenolová modř nebo xylenkyanol. Separační chování respektive tzv. komigrace do fragmentů DNA s dvěma řetězci je závislá na typu agarózy, tloušťce gelu a elektroforézním ústojném roztoku.

Pro hrubou orientaci: bromfenolová modř migruje při ústojné kapalině 1xTAE (viz elektroforézní ústojná kapalina) a standardním 1% agarózovém gelu zhruba jako fragment DNA s 650 základními páry.

Barvení nukleových kyselin

Protože pro obarvení nukleových kyselin je k dispozici řada možností, odkazujeme na tomto místě na příslušnou odbornou literaturu (Sambrook et. al., 1989).

Vyhodnocení / dokumentace

Stanovení velikosti fragmentů nukleových kyselin je možné provádět porovnáním s fragmenty délkového standardu. Přesný popis postupu je popsán například v knize „Molekulare Genetik“ od R. Knipperse (2006).

Pokyny pro čištění a ošetřování

Pozor: Elektroforézní komoru je nutno před čištěním odpojit od elektrického napájení.

Elektroforézní komoru a hřebeny je nutno po každém použití vyčistit vlažnou vodou. Pokud je to potřebné, je možné přidat do vody malé množství šetrného prostředku na mytí nádobí. Nepoužívejte pro čištění kartáče apod., protože by mohlo dojít k poškození platinových elektrod. Vypláchnutím elektroforézní komory po vyčištění demineralizovanou nebo destilovanou vodou zabráníte vzniku skvrn vodního kamene.

Nenechte stát elektroforézní komoru nevyčištěnou po dobu několika hodin nebo dokonce přes noc, protože by na okrajích mohlo dojít k naschnutí gelu nebo ústojného roztoku, tyto zbytky je pak velice těžké až nemožné beze zbytku odstranit.

Pozor: Pokud možno zabránit kontaktu elektrických přípojek s vodou. Pokud by k němu přesto došlo, otřít tyto přípojky dosucha měkkou utěrkou, případně je nechat na vzduchu vyschnout. Nepoužívejte pro osušení papír, protože ten bývá často hrubý a tvrdý a může poškrábat povrch. Zařízení rovněž neosušejte fénem, protože horký vzduch může poškodit přípojky, šroubové spoje a akrylát elektroforézní komory.

Pozor: Pro čištění nepoužívejte etanol nebo jiná organická rozpouštědla. Mohly by tak vzniknout trhlinky, propadliny nebo jiné nežádoucí změny materiálu (zakalení, atd.).

Potřebné materiály a receptury

Elektroforézní ústojný roztok (pufr)

Elektroforézní ústojný roztok poskytuje ionty potřebné pro elektroforézu a zajišťuje konstantní hodnotu pH tak, aby si nukleové kyseliny zachovaly žádoucí náboj. Nukleové kyseliny mají v zásaditém až neutrálním prostředí záporný náboj. Elektroforézní ústojný roztok zpravidla obsahuje i komponenty, které chrání nukleové kyseliny před degradací, např. látku EDTA, která vytváří komplexy dvojmocných kationtů a inhibuje tak D-výstupky.

Při elektroforéze RNA jsou navíc přidávány látky, které zabraňují nežádoucím projevům sekundárních struktur u RNA. Jaké to jsou a jaké je složení ústojného roztoku pro

denaturované gely RNA je možno zjistit v příslušné odborné literatuře (viz kapitola Literatura).

Na tomto místě jsou popsány běžné elektroforézní ústojné roztoky TAE a TBE pro elektroforézu DNA za podmínek bez denaturace. TAE přitom označuje tris-acetát-EDTA, TBE tris-borat-EDTA. Obě zkratky vyplývají z chemických složek elektroforézního ústojného roztoku.

Ústojný roztok TAE separuje DNA o něco rychleji, má ale nižší kapacitu než TBE. Ta je však důležitá pouze při velmi dlouhém průběhu elektroforézy, nebo pokud jsou použity oddělené zásobníky ústojného roztoku na straně anody a katody. U popisované elektroforézní komory „Mini“ je však nosný gel překryt ústojným roztokem celý, roztok proto může dobře cirkulovat. Tato konstrukce zabraňuje změnám hodnoty pH u pólů.

Ústojný roztok TBE má rovněž sklon k vysrážení a vzniku krust na bocích skladovací nádoby, které lze jen obtížně rozpustit zahříváním ve vodní lázni.

Na základě všech těchto skutečností je možno doporučit pro většinu aplikací ve školství použití elektroforézního ústojného roztoku TAE.

Ústojné roztoky si můžete připravovat sami, nebo si můžete objednat jejich koncentráty například u firmy Schlüter Biologie, Jörk Klawun. Tyto pak stačí pouze naředit H₂O (destilovanou), čímž získáte okamžitě použitelný pracovní roztok (elektroforézní ústojný roztok s normální koncentrací (1x)).

Agaróza, objem gelu a jeho koncentrace

Ačkoli jsou nabízeny různé agarózy, největší význam má určitě tak zvaná standardní agaróza. Pro vytvoření vrstvy gelu v popisované komoře je zapotřebí zhruba 40 ml roztoku. Připravit je nutno o něco více roztoku, protože část ho vždy zůstane na nádobě.

V závislosti na obsahu agarózy v gelu jsou optimálně separovány molekuly různé velikosti, jak ukazuje následující tabulka. Speciální agarózy nebo jiné separační matrice přicházejí v úvahu u velmi malých nebo naopak velmi velkých nukleových kyselin.

Optimální separační rozsah DNA s dvěma řetězci při různém obsahu agarózy

| obsah agarózy (%) | agaróza (g) | pufr (ml) | optimální separační oblast (kbp) |
|-------------------|-------------|-----------|----------------------------------|
| 0,5 | 0,25 | 50 | 1 – 15 |
| 0,7 | 0,35 | 50 | 0,8 – 10 |
| 1,0 | 0,5 | 50 | 0,5 – 7 |
| 1,2 | 0,6 | 50 | 0,3 – 6 |
| 1,5 | 0,75 | 50 | 0,2 – 4 |
| 2,0 | 1,0 | 50 | 0,1 - 3 |

Plnicí ústojný roztok/ústojný roztok vzorku

Analyzované vzorky je nutno před nanesením do gelu smíchat s vhodnou ústojnou kapalinou (pufrem). Ústojné roztoky vzorků obsahují barviva pro zviditelnění postupu migrace, a dále glycerol, sacharózu apod., aby byly vzorky těžší než elektroforézní ústojná kapalina a klesly při nanesení do kapsiček v gelu. Jako barvivo je v ústojných roztocích pro vzorky často používána bromfenolová modř nebo xylenkyanol. Separační chování respektive tzv. komigrace do fragmentů DNA s dvěma řetězci je závislá na typu agarózy, tloušťce gelu a elektroforézním ústojném roztoku.

Pro hrubou orientaci: bromfenolová modř migruje při ústojné kapalině 1xTAE (viz elektroforézní ústojná kapalina) a standardním 1% agarózovým gelu zhruba jako fragment DNA s 650 základními páry. Za stejných podmínek migruje xylenkyanol jako fragment s 5000 základních párů.

Délkové standardy DNA

Délkové standardy (markery) DNA je nutno nanést na gel minimálně v jedné stopě, aby bylo možno kontrolovat separaci a stanovit velikost vzorků. Pokud je nanesena specifická koncentrace známého markeru, je možné podle něj odhadnout i množství DNA.

Délkové standardy DNA často tvoří rozštěpené plazmidy s fragmenty o známé velikosti. Částečně jsou definované fragmenty DNA vytvářeny i technikou PCR.

Barvení nukleových kyselin

Protože pro obarvení nukleových kyselin je k dispozici řada možností, odkazujeme na tomto místě na příslušnou odbornou literaturu (Sambrook et. al., 1989).

Problémy: příčiny a jejich odstranění

Zde naleznete některé příčiny problémů, které se typicky vyskytují při praktickém použití, a jejich odstranění. Tyto problémy mohou být zaviněny materiálem nebo chybou uživatele.

Pásky nejsou rovné

Nebyl gel nalit na nerovný podklad? Nebylo použito příliš velké napětí? Nebyla místo elektroforézního ústojného roztoku použita H₂O? Je složení elektroforézního ústojného roztoku správné?

Nebyly chemikálie použité pro přípravu elektroforézního ústojného roztoku prošlé nebo příliš staré? Nebyl elektroforézní ústojný roztok špatně naředěn?

Pásky probíhají v některých částech gelu nerovnoměrně

Jsou platinové elektrody neporušené a je proud v celé jejich délce konstantní? To je patrné z tvorby bublin u elektrod za jejich provozu. Zkontrolujte, zda nedošlo k deformaci dna elektroforézní komory. Případně mohl být opakovaně naléván agarózový gel s příliš vysokou teplotou. Gel musí před nalitím vždy vychladnout na cca 60°C, aby nedošlo k deformaci akrylátu.

Agaróza vytéká z plochy určené pro nalévání gelu

Jsou bílé plastové lišty, které vymezují oblast po gel na levé a pravé straně, ve správné poloze a upevněné? Je objem připraveného roztoku správný? Nebylo nalito příliš mnoho gelu, takže ten nyní přetéká?

Neostré pásky

Byl gel zcela ztuhlý? Standardní agaróza normálně zcela ztuhne při pokojové teplotě za 30 minut. Pro ztuhnutí agarózy Low-Melting je zapotřebí výrazně delší čas a proto by měla být uložena v chladničce. Při delším skladování (několik hodin až několik dní) je nutno přelit ztuhlý gel trochou elektroforézního ústojného roztoku (pracovního). Byl pro přípravu gelu použit elektroforézní ústojný roztok?

Pohybuje se proud a napětí v normálním rozsahu? Příliš vysoký proud může mít za následek silné zahřívání a roztavení gelu.

Nebylo do gelových kapsiček aplikováno příliš velké množství nukleových kyselin, což vedlo k „rozmazání“ pásku?

Poškození kapsiček při vytahování hřebenu

Při vytahování hřebenu musí být gel zalitý trochou elektroforézního ústojného roztoku, pak je jeho vytažení snazší. Hřeben je nutno vytáhnout při mírném kývání. Tzn. střídavě mírně zvedat a opět spouštět hřeben na obou koncích (tím dojde k jeho uvolnění od agarózy), poté jej pomalu a rovnoměrně vytáhnout.

Hřeben hned po použití pečlivě omýt vlažnou vodou, protože případné usazeniny na něm by vedly při následném použití k poškození kapsiček.

Migrace vzorků je nápadně pomalá

Nebyl elektroforézní ústojný roztok špatně naředěn? Není gel překrytý příliš vysokou vrstvou elektroforézního ústojného roztoku? Příliš silná vrstva elektroforézního ústojného roztoku nad gelem má za následek zpomalení migrace, protože klesá odpor a zvyšuje se průtok proudu.

Vzorky zůstávají v kapsičkách, difundují z gelu nebo se pohybují „zpět“

Zkontrolujte elektrický obvod tvořený elektroforézní komorou a síťovým adaptérem. Platinové elektrody a banánové zástrčky musí být nepoškozené. Průtok proudu můžete zkontrolovat tak, že naplníte komoru pouze elektroforézním ústojným roztokem (bez gelu), nasadíte bezpečnostní víko a nastavíte na síťovém adaptéru požadované napětí. Síťový adaptér musí ukazovat průtok proudu. U platinových elektrod by měly být vidět drobné bublinky.

„Zpět“ se pohybující vzorky signalizují použití špatné polarizace. Protože bezpečnostní víko je možné nasadit na komoru pouze v jedné poloze, je prohození pólů možné pouze u síťového adaptéru.