Ocena efektywności i jakości wyizolowanego DNA

I. Elektroforeza wyizolowanego genomowego DNA na żelu agarozowym.

1. Przygotowanie 0,8% żelu (na „male saneczki”, 8 dołków):

- **0,4 g agarozy** rozpuszczamy w **50 ml 1x buforze TBE**. Podgrzewamy w mikrofalówce ok. 1-1,5 min, nie dopuszczając do zagotowania.

-po ostudzeniu (tem. ciała), dodajemy **3 µl barwnika fluorescencyjnego** Midorii green *(nietoksyczny; zastępuje toksyczny bromek etydyny; interkaluje z DNA podczas elektroforezy umożliwiając po elektroforezie obejrzeć otrzymanego produktu, po wzbudzeniu UV*)

- roztwór agarozy wylewamy do saneczek w wstawionym grzebieniem na odpowiednią ilość dołków. Usuwamy pęcherzyki powietrza tipsem. Czekamy ok 15-25 min aż żel zastygnie.

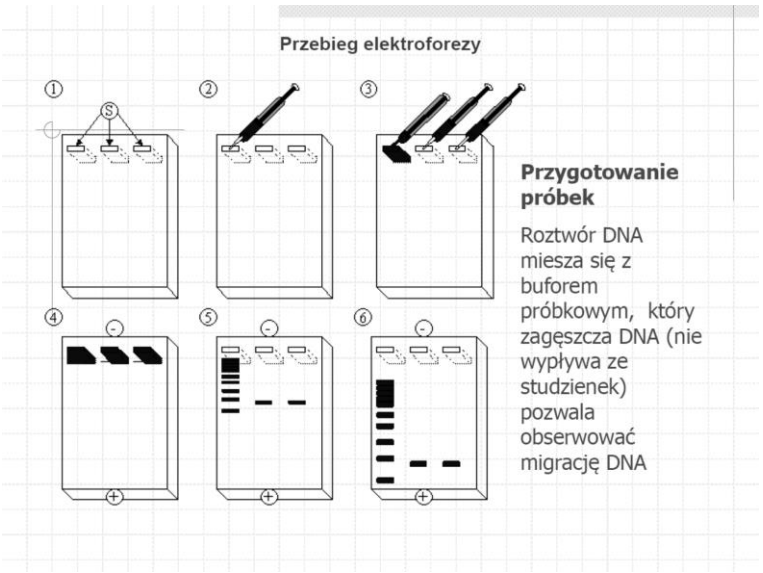
2. Przygotowanie roztworu DNA oraz wzorca (drabinka na 1 kb; zakres od 250 – 10000 bp):

Każda próba:

- 12 µl danej próbki DNA rozpuszczone w wodzie
- 3 µl buforu obciążającego Loading6x

Drabinka:

- 3µl gen ruler 1kb (już z Loading6x)
- 4µl wody jałowej



3. Elektroforeza

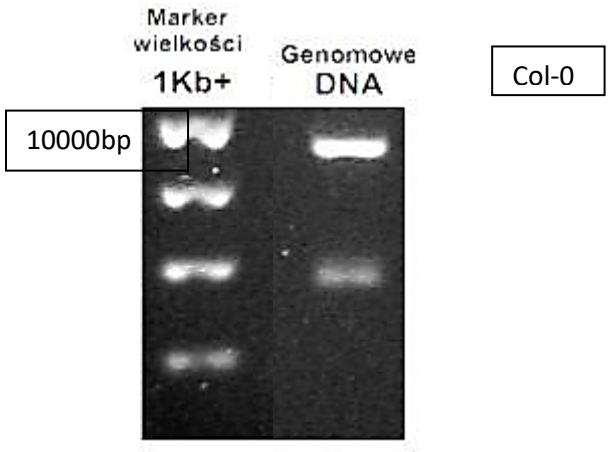
- do urządzenia wlać bufor 1XTBE
- zainstalować saneczki z żelem agarozowym tak aby grzebień znajdował się od strony anody (-);
- wyjąc grzebień
- do dołków nanieść kolejno:

ok 5 µl roztworu drabinki, próbę 1, 2, 3, 4.

- zamknąć pokrywę, podpiąć anodę i katodę
- ustawić napięcie prądu na 100V

-uruchomić elektroforezę na ok 30 minut.

- zakończenie elektroforezy: aparat odłączany jest od źródła prądu, żel przenosimy pod transiluminator UV. Oceniamy efekt elektroforezy –powinien być widoczny wyraźny, bez smug, prążek genomowego DNA na wysokości ok 7000-10000bp.



Bufor elektroforetyczny 10X TBE *zawiera 1.0 M Tris (pH 8.3), 0.9 M kwasu borowego oraz 10 mM EDTA. Aby otrzymać roztwór roboczy* ***(1X)*** *należy uzupełnić destylowaną wodą (na każde 50 ml dodać 450 ml wody) otrzymując roztwór zawierający 100 mM Tris (pH 8.3), 90 mM kwasu borowego oraz 1 mM EDTA.*

Uwagi

- Stężony bufor powinien być rozcieńczony do roboczego stężenia 1X przed użyciem.

- Zalecamy użycie świeżo sporządzonego buforu przed każdą elektroforezą.

Pomiar ilości DNA w próbie z użyciem spektrofotometru Viarioskan (Thermo scientific)

Wprowadzenie.

Po skończonej izolacji kwasów nukleinowych musimy wiedzieć jakie jest stężenie i czystość materiału przed wykonaniem jakichkolwiek badań. Podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych używa się rozpuszczalników organicznych (fenol, chloroform, alkohole) oraz soli (np. chlorek lub izotiocyjanian guanidyny), które mogą inhibować reakcje enzymatyczne takie jak PCR, RT-PCR, znakowanie rybonukleotydów i inne. RNA zanieczyszczone solami także szybciej degraduje (nawet przechowywany w -80 °C!). Dlatego tak ważna jest poprawna analiza jakościowa i ilościowa każdej próbki. Wygodną formą takiej analizy jest pomiar absorbancji przy długości fali 230, 260 i 280nm. Obecnie większość laboratoriów dysponuje systemami typu NanoDrop (Thermo Scientific), które mierzą te parametry w kropli <1,5ul i automatycznie przeliczają absorbancję na stężenie i czystość białkową oraz organiczną. Wyznaczają także wykres absorbancji, bardzo pomocny przy ustalaniu źródła zanieczyszczeń kwasów nukleinowych

Analiza jakościowa: *maksimum absorbancji białek, częstego zanieczyszczenia DNA przy izolacji manualnej, wynosi 280 nm, zaś zanieczyszczenia organiczne posiadają najwyższą absorbancję poniżej 240 nm. Przyjęto więc arbitralnie 230nm jako długość fali dobrze określającą stopień zanieczyszczeń rozpuszczalnikami organicznymi.*

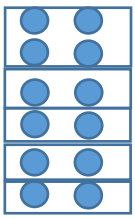
* ***Miarą stopnia czystości kwasów nukleinowych jest stosunek A260/230 oraz A260/280****. Przyjmuje się, że czyste DNA lub RNA ma A260/280>1,8 i A260/230>1,8. Idealnie czyste RNA rozpuszczone w wodzie DEPC może mieć A260/230 nawet ok. 2,20.Na dokładną wartość tego parametru nieznacznie wpływa użyty bufor, ale generalnie parametry dobrze wyizolowanego DNA lub RNA oscylują wokół 1,8 – 2,05.Najprościej rzecz ujmując oznacza to, że absorbancja przy maksimum dla kwasów nukleinowych (A260) jest 2x większa niż absorbancja tła i zanieczyszczeń.*

* *Krytyczne dla reakcji enzymatycznych są wartości A260/280 i A260/230<1,4. Niższe wartości mogą spowodować bardzo kiepskie wyniki amplifikacji np. metodą Real-Time PCR czy też słabe znakowanie sond do mikromacierzy. Przy A260/230<1 nawet zwykły RT-PCR może okazać się problemem. Dlatego w przypadku kiepskiej czystości należy powtórzyć ekstrakcję alkoholem.*

Długość fali (nm)	substancje absorbujące
230	EDTA, polisacharydy, etanol
260	DNA, RNA
270	fenol
280	białka
320	drobiny komórkowe

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przetrzeć płytkę µDrop™ etanolem, delikatnie wysuszyć ręcznikiem papierowym
2. Nanieść próby kontrolne (jałowa woda) oraz próby badane na dołki, po 2 µl



1 woda, po 2 µl
2
3 próbka 1 po 2 µl
4 próbka 2 po 2 µl
5 próbka 3 po 2 µl
6 próbka 4 po 2 µl itd.

Wykonać pomiary. Ocenić czystość prób i efektywność izolacji (z 25mg suchej tkanki → 5 - 40µg genomowego DNA)
Stosunek absorbancji świadczącej o czystości wyizolowanego DNA
A260/280 >1,8 (poniżej 1,4 nie nadaje się do amplifikacji)
A260/230>2,0
DNA concentration (µg/ µl) = Abs260 x 50 µg/ µl