

1 Introduksjon

Dette elektroforesekommeret er utviklet for å gjøre det mulig å separere protein- og nukleotidmolekyler. Proteiner separeres på celluloseacetatstrimler, mens DNA-fragmenter separeres på agarosegel.

2 Sikkerhet

Elektroforese krever høye spenninger, og derfor er strenge sikkerhetstiltak nødvendig.

Kammeret er utstyrt med en mekanisk sikkerhetslås som hindrer tilgang til innsiden når strømmen er på. Når lokket fjernes, brytes strømtilførselen til elektrodene umiddelbart.

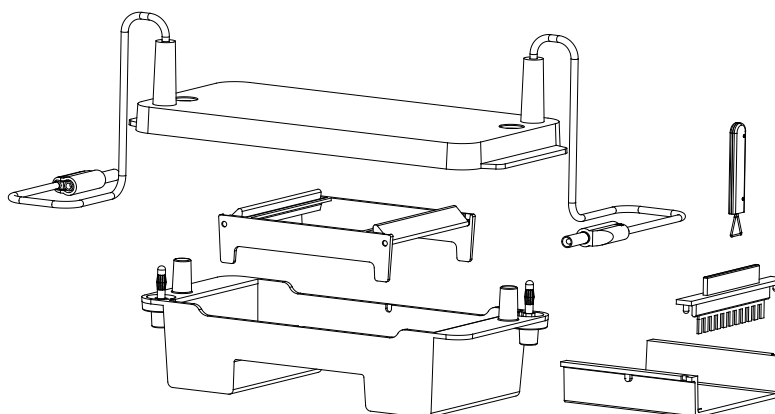
Alle strømkilder fra JEULIN er i tillegg utstyrt med sikkerhetskontakter.

Følgende forholdsregler må alltid følges:

- Utfør alle væskeoverføringer på avstand fra strømkilden. Unngå å søle eller sprute vann på strømkilden.
- Unngå unødig strekk i kablene. Plasser kammeret så langt unna strømkilden som mulig, spesielt når den er i bruk.
- Sørg for at kammerets ytre overflate er helt tørr før det kobles til strømkilden.
- Slå på enheten først når alle tilkoblinger er gjort, kammeret er lukket, og de ovennevnte forholdsreglene er fulgt.

3 Beskrivelse og innhold

3.1 Kammeret



Elektroforesekommeret består av følgende deler:

- **Tankbunn (1):** Delt i to kamre, med elektroder koblet til bananplugger og nedsenket i bufferløsningen.
Dimensjoner (L x B x H): 20 x 9 x 5 cm.
- **Gjennomsiktig lokk (2):** Utstyrt med to snorer.
Lokket fjernes ved å løfte ytterkantene med pekefingerne mens tomlene trykker mot de to sylindriske tappene som går gjennom lokket. Dette gjør det mulig å åpne lokket uten å flytte kammeret eller søle ut væsken.

- **Støtte til agarosegel (3):** Plasseres midt i kammeret, og holdes på plass av to styretapper i kantene.
Dimensjoner (L x B x H): 87 x 80 x 22 mm.
- **Kam (4):** Med 11 tenner, brukt til å lage brønner for påføring av DNA-prøver. Festes på enden av støtten ved hjelp av utsparinger laget for dette formålet.
- **Stripeholder (5):** Brukes ved proteinelektroforese. Holderen er utstyrt med bevegelige kiler som sikrer at endene av celluloseacetatstrimlene har kontakt med bufferløsningen.
Dimensjoner (L x B x H): 105 x 82 x 27 mm.
- **Serumapplikator (6):** Brukes til å påføre svært tynne serumlinjer på acetatstrimlene. Etter migrasjon og separasjon gir dette strimler med tydelige og skarpe bånd. Applikatoren sikrer også avsetninger med jevnt volum.

3.2 Anbefalt spenning

Avhengig av hvilken type molekyler som skal separeres, gjelder følgende spenninger:

- **DNA-fragmenter på agarosegel:** 100V
- **Proteiner på celluloseacetat:** 160-250 V

Strømforsyningen Evolution 100/160 V, ref. 281 287, kan levere begge spenningene som kreves for begge typer praktisk arbeid.

4 Separasjon av DNA-fragmenter ved elektroforese på agarosegel

4.1 Teori før praksis

❖ Prinsippet for DNA-gelelektroforese

I et svakt basisk miljø oppfører DNA seg som en polyanionisk kjede (med ioniserte fosfatgrupper). Når DNA-fragmenter av ulik størrelse plasseres i en agarosegel og utsettes for et elektrisk felt, beveger de seg med ulik hastighet avhengig av molekylvekten. Fordi fragmentene har samme relative ladning, er det hovedsaklig gelens silingseffekt som avgjør hvor raskt de vandrer. Jo større fragmentene er, desto langsommere beveger de seg. Fragmentstørrelse uttrykkes vanligvis i basepar (bp) eller kilobaserpar (Kb, 1 Kb = 1000 bp).

❖ Restriksjonsfragmenter

DNA-et som brukes er lambda-bakteriofag-DNA (49 Kb), fordøyd med restriksjonsenzymer (EcoRI eller Hind III). Fordøyelsen gir et begrenset antall fragmenter, noe som gjør gelen lettere å tolke.

Størrelse på fragmentene (bp):

- **Hind III:** 23130 9416 6557 4361 2322 2027 564 125
- **EcoRI :** 21226 7421 5804 5643 4878 3530

Hind III-digestert lambda-DNA brukes ofte som referanse (størrelsemarkør) for å bestemme fragmentstørrelser i andre prøver.

4.2 Mål og prinsipper

Denne øvelsen gir en praktisk tilnærming til Southern blot-teknikken:

- Klyving av DNA med restriksjonsenzymmer
- Separasjon av fragmentene ved elektroforese
- Ikke-spesifikk påvisning av fragmentene etter separasjon

4.3 Nødvendig utstyr og materialer

MERK: Dette er en uoversatt liste over produkter fra vår leverandør, Jeulin. For mer informasjon, se deres nettside: jeulin.com

Qté	Désignation	Référence
1	Alimentation électrique Evolio 2 Cuves 70/140 V	281 120
1	Cuve à électrophorèse ADN-Protéines	591 031
Consommables / réactifs		
1	Tampon TBE	105 173
1	ADN de phage digéré par Hind III	117 039
1	ADN de phage digéré par EcoR1	117 038
1	Solution de charge	117 037
1	Colorant pour électrophorèse d'ADN	105 171
1	Tampon pH 6.87	107 195
1	Tampon pH 9.18	107 196
1	Ethanoate de sodium	107 112
1	Acide éthanoïque à 80 %	106 110
Verrerie		
1	Fiole de 1000 mL	713 270
1	Fiole de 250 mL	713 268
2	Entonnoir	713 027
1	Eprouvette de 250 mL	723 166
1	Eprouvette de 100 mL	723 165
1	Capsule verre	713 201
1	Erlenmeyer de 250 mL à col large	713 207
1	Bécher de 250 mL	713 196
2	Bécher de 100 mL	713 513
1	Pipette graduée de 5 mL	713 281
1	Cristalliseur 1,5 L	713 497
Matériel annexe		
1	Agitateur magnétique	701 182
1	Bain-marie ou four micro-ondes	
1	Balance au 1/100 ^{ème}	701 243
1	Pipette automatique	703 397
1	Cônes pour micropipette	723 136
1	Tubes Eppendorf	723 184
1	Portoir pour tubes Eppendorf	701 153
1	Spatule	703 101
1	Testeur de pH	701 217
1	Turbulents droits 1 bague	703 178
1	Baguette magnétique	703 251

4.4 Prosedyre

Forberedelsestid:

- Gelforberedelse, helling, montering, migrering, farging, avfarging: 16 timer
- Observasjonstid i klasserommet: Noen få minutter

4.4.1 Forberedelse av løsninger

❖ Buffer (ca. 1 time):

- Én tank krever omtrent 300 ml buffer.
- Hell innholdet i én pose TBE-buffer i en 1-liters målekolbe.
- Skyll posen med destillert vann og tøm restene i kolben under omrøring.
- Når bufferen er helt oppløst, fortynn løsningen **10 ganger** for å få sluttbufferen.
- Kontroller at pH er mellom 8,2 og 8,3. Juster med HCl eller NaOH som nødvendig.

❖ Agarosegel (ca. 1 time og 15 minutter):

- Bland 83 ml sluttbuffer med 0,5 g agarosepulver i en 250 ml Erlenmeyer.
- Varm og rør blandingen på magnetrører til agarosen er fullstendig oppløst. Unngå bobler.
- La løsningen kjøle til ca. 50 °C.
- Klargjør gelstøtten: tett endene med sterk tape og plasser kammen i de avmerkede hakkene. Sørg for at støtten står helt horisontalt.
- Hell den avkjølte løsningen jevnt i støtten til nivået ligger rett under kammens tenner.
- La gelen stivne 10 min ved romtemperatur + 10-15 min i kjøleskap.
- Fjern kammen forsiktig rett opp, slik at brønnene blir stående intakte.

❖ DNA-forberedelse:

- Tin DNA-et rett før bruk (5 min i varmt vann + 2 min i isvann). Dette forhindrer at fragmentene rekombinerer.
- Fortynn DNA til en konsentrasjon på 0,07 µg/µL. Beregn volumet som skal tas med formelen $C1 \times V1 = C2 \times V2$.
 - C1: Konsentrasjon (µg) DNA per ml
 - V1: Volum av DNA som skal prøvetas i µL
 - C2: Konsentrasjon som skal oppnås, dvs. 0,07 µg
 - V2: Endelig volum av løsningen, dvs. 80 µL
- Tilsett lasteløsning (20 µL) til DNA-løsningen (80 µL) og bland. Lasteløsningen gjør prøven tyngre og inneholder bromfenolblått (BBP), som fungerer som migrasjonsmarkør (vandrer omtrent som et 300 bp DNA-fragment).

MERK: Ubrukt DNA må så snart som mulig settes tilbake i -15 °C (selv om det er en fortettet prøve).

Produktet tåler lett flere fryse-tine-sykluser uten å miste sine egenskaper. Imidlertid bør tine-tiden, hvor det er mulig at mikroorganismer kan forårsake nedbrytning, holdes så kort som det lar seg gjøre.

4.4.2 Påføring av DNA

- Pipetter 6 μ L i hver brønn (eller annenhver) uten å overfylle.
- Unngå å berøre bunnen av brønnene med pipettespissen.

4.4.3 Start av elektroforese (ca. 1,5 time)

- Plasser gelstøtten i tanken, med brønnene nær katoden (–).
- Fyll hvert kammer med buffer til gelen dekkes ca. 2/3. Den må ikke dekkes helt. For høyt nivå kan gi for høy strømstyrke, slik at strømkilden slår seg av.
- Sett på lokket og koble kablene riktig (farge mot farge).
- Still inn spenningen på 100 V, koble til strømnettet og slå på.
- Etter ca. 5 minutter skal du se kondens på lokket. Det er tegn på at alt fungerer.
- For å stoppe migrasjonen: slå av, koble fra, og eventuelt tapp av litt buffer hvis sikringen slår seg ut.

4.4.4 Stopp og farging (flere timer)

- Forbered 125 ml 0,5 M natriumacetat (5,12 g i 125 ml vann).
- Juster pH til 5,2 med 80 % eddiksyre.
- Lag en 0,1 % fargeløsning i denne bufferen.
- Stans elektroforesen når BBP har migrert 2/3 av gelen.
- Ta ut gelen og legg den i en krystalliseringskål.
- Dekk med fargeløsningen i 5 minutter, tøm og skyll med destillert vann.
- La gelen ligge i rent vann i flere timer. DNA-båndene blir gradvis tydeligere.

4.5 Resultater og analyse: noen muligheter å utforske

- Diskuter hvordan restriksjonsenzymmer klipper DNA, og vis hvordan fragmentstørrelse påvirker migrasjonshastigheten.
- Bruk Hind III-fragmentene som standard for å bestemme størrelsen på EcoRI-fragmenter. Lag en logaritmisk standardkurve (log bp vs. migrasjonsavstand).
- Diskuter metodens følsomhet: svært små DNA-mengder kan påvises.
- Sett elektroforese inn i en større sammenheng, f.eks. Southern blot eller prenatal diagnostikk.

4.6 Variable områder

Andre restriksjonsenzymmer kan benyttes.

4.7 Tips

- Hell ikke gelen når den er for varm. Du skal kunne holde kolben i hånden.
- Ikke bruk vanlig kontortape, da det fester for hardt og kan ødelegge gelen.
- Kontroller DNA-konsentrasjonen fra leverandøren før fortynning.
- Følg BBP-flekken under migrasjonen for å vurdere fremdriften.
- Gelen kan lages på forhånd og oppbevares i minst en uke ved 4 °C i vann.
- Unngå luftbobler i gelen ved forsiktig helling.
- Hvis strømkilden stopper: fjern litt buffer og start på nytt.
- Hvis BBP ikke har migrert etter 15 minutter: kontroller buffernivået.
- Skjeve båndlinjer påvirker ikke synligheten, men kan gjøre analysen vanskeligere.

4.8 Pedagogiske og tekniske forslag

Denne øvelsen egner seg godt for undervisning i enzymspesifisitet og DNA-separasjon. Sammenligning av EcoRI- og Hind III-fordøyd DNA gjør det enkelt å demonstrere både prinsippene bak restriksjonsenzymer og hvordan fragmentstørrelse påvirker migrasjon.

Diskusjonen kan utvides til Southern blot og diagnostiske metoder, der elektroforese fungerer som grunnlag for videre DNA-analyser.