

INTRODUKSJONSGUIDE TIL ELEKTROFORESE

Hva er elektroforese?

Elektroforese er en teknikk for å separere DNA, RNA og proteiner etter størrelse.

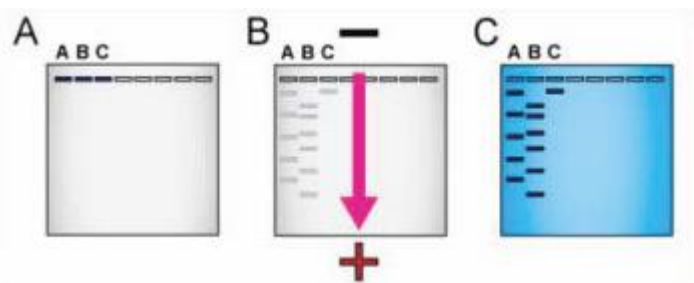
Hva trenger jeg for å separere en blanding av DNA-molekyler?

I tillegg til DNA-prøven trenger du:

- **Appliseringsbuffer** (gel loading buffer) – inneholder glyserol for å sikre at DNA-prøvene er tyngre enn elektroforesebufferen og dermed synker ned i brønnene i tillegg til et synlig fargestoff for å følge migrasjonen gjennom gelen.
- **Agarose** – et polysakkarid som brukes som separasjonsmatriks.
- **Elektroforesebuffer** – inneholder ioner som er nødvendig for å lede en elektrisk strøm gjennom gelen og holde pH stabil under forsøket.
- **Elektroforesekar** – til elektroforesebuffer og gelen, har positiv og negativ elektrode.
- **Spenningskilde** – genererer elektrisk strøm som er nødvendig for å bevege DNA-molekylene gjennom gelen.
- **Mikropipette** – til å overføre DNA-prøvene til brønnene i gelen.
- **Fargestoff** – for å synliggjøre DNA.

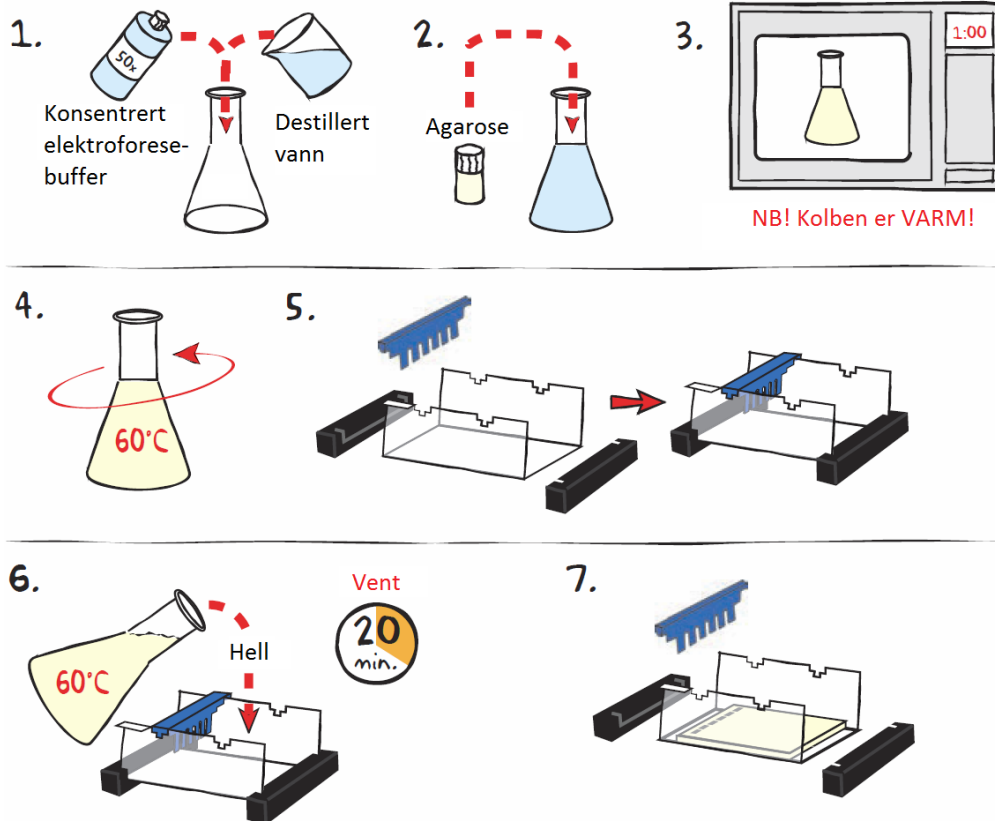
Hvordan separeres DNA-fragmenter ved elektroforese?

Blandingen av DNA-molekyler tilsettes til fordypninger (brønner) i gelen og en elektrisk strøm passerer gjennom gelen (Figur 1A). Fosfatgruppene i ryggraden av DNA gir DNA-molekylene negativ ladning og gjør at de beveger seg gjennom gelen mot den positive elektroden (Figur 1B). Agarose-gelen består av porer som DNA passerer gjennom på sin vandring mot den positive elektroden. Små DNA-molekyler beveger seg lett gjennom porene, mens store fragmenter hindres i større grad. Dermed vandrer DNA-molekyler av ulik størrelse med forskjellig hastighet gjennom gelen og blir separert i distinkte bånd. Etter elektroforesen synliggjøres båndene med et fargestoff som binder DNA (Figur 1C).



Figur 1. Skjematisert oversikt over prinsippet for elektroforese. A) Prøvene appliseres i brønner i gelen. B) En elektrisk strøm gjør at de negativt ladete DNA-molekylene vandrer gjennom gelen mot den positive elektroden. C) Etter endt elektroforese farges gelen med et fargestoff som synliggjør DNA-båndene.

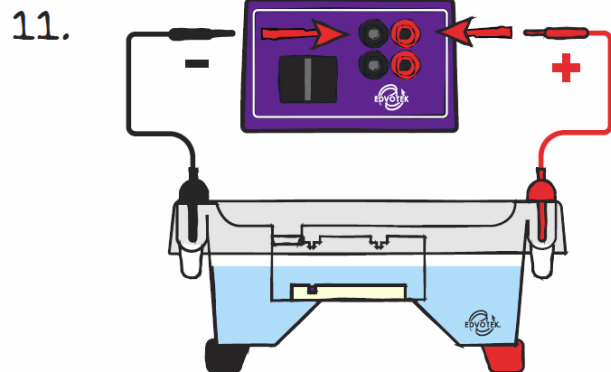
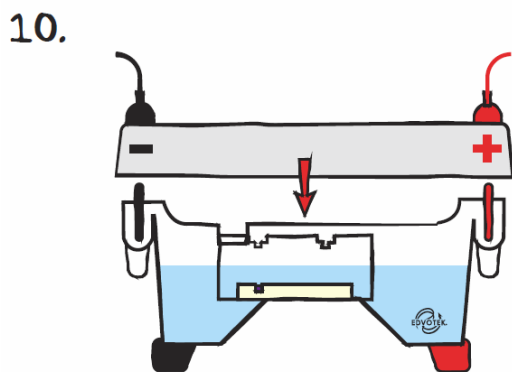
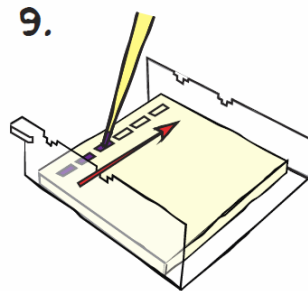
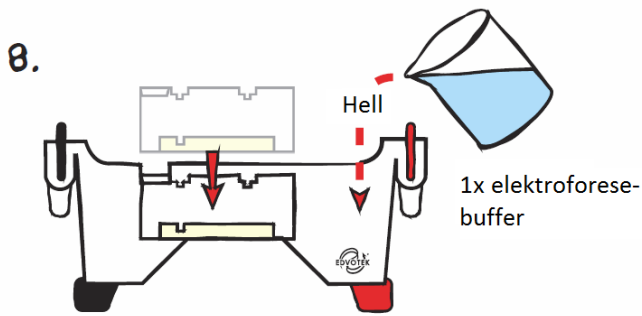
Elektroforese trinn-for-trinn



- Fortynn den 50x konsentrerte elektroforesebufferen med destillert vann for å lage 1x elektroforesebuffer. Se Tabell A for buffervolum til gelen og Tabell B (neste side) for buffervolum til elektroforesekarret.
- Tilsett agarosepulver og 1x elektroforesebuffer i en 250 ml erlenmeyerkolbe, se Tabell B.
- Løs agarosepulveret ved å koke opp løsningen i en mikrobølgeovn på høy effekt i 1 minutt. Ta flasken forsiktig ut av mikrobølgeovnen og bland godt ved å rotere kolben. Fortsett oppvarmingen gjentatte ganger (høy effekt i 15-25 sekunder) til agarosen er fullstendig løst og løsningen er klar som vann.
- Avkjøl agaroseløsningen under rennende vann mens du roterer kolben til temperaturen er ca. 60 °C (når du kan holde kolben i hånden uten å brenne deg).
- Forsegl endene på et gelstøpe-kammer med gummiendestykkene (gjelder gelkarene fra Edvotek) eller tape og sett en kam i sporene i enden som skal plasseres nærmest den negative elektroden i elektroforesekarret.
- Hell den avkjølte agaroseløsningen i gelkammeret. Fjern eventuelle bobler med en pipettespiss og la stå på et horisontalt underlag til gelen har stivnet (ca. 20 minutter).

Tabell A		Til støping av en enkelt 0,8 % agarosegel			
Størrelse gelkammer	Agarose	50x elektroforesebuffer	Destillert vann	Totalvolum	
7 x 7 cm	0.23 g	0.6 ml	29.4 ml	30 ml	
7 x 10 cm	0.39 g	1.0 ml	49.0 ml	50 ml	
7 x 14 cm	0.46 g	1.2 ml	58.8 ml	60 ml	

7. Fjern endestykkene/tapen og kammen forsiktig. Pass på at ikke gelen revner og brønnene blir ødelagt.



8. Legg gelkammeret med gelen i elektroforesekaret med brønnene nærmest den negative (svarte) elektroden. Hell 1x elektroforesebuffer i elektroforese-karet til buffernivået er ca. 5 mm over gelen. Se til at det er buffer i alle brønnene. Se Tabell B for anbefalte volumer.
9. Appliser DNA-prøvene (ca 25 μ l) i brønnene på gelen. Pass på at du ikke stikker pipettespissen for langt ned slik at det blir hull i brønnene. **Tips:** Dersom brønnene er vanskelig å se kan det hjelpe å legge et svart/mørkt papirark under elektroforesekaret.
10. Sett lokket på elektroforesekaret. Sjekk at den negative (svarte) elektroden på lokket er koblet til den negative (svarte) elektroden på elektroforesekaret og tilsvarende for den positive (røde) elektroden.
11. Koble til spenningskilden og start elektroforesen. Tiden det tar å separere DNA-molekylene avhenger av spenningen, størrelsen på elektroforesekaret og agarosekonsentrasjonen i gelen. Se Tabell C (forrige side) for anbefalte innstillinger av elektroforeseapparatene fra

Tabell B 1x elektroforesebuffer (til elektroforesekaret)			
Edvotek elektroforesekar	Totalvolum	Fortynning 50x buffer + dest. vann	
M6+	300 ml	6 ml	294 ml
M12	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

Tabell C Tid og spenning (anbefalinger for 0,8 % agarosegeler)		
	M6+	M12 & M36
Volt	Min. / Max.	Min. / Max.
150	10 / 15 min.	20 / 30 min.
125	15 / 20 min.	35 / 45 min.
70	35 / 45 min.	60 / 90 min.
50	50 / 80 min.	95 / 130 min.

Edvotek. Pass på at spenningen ikke er høyere enn anbefalt, for høy spenning kan resultere i at gelen smelter.

12. Når elektroforesen er ferdig skrus strømmen av før lokket fjernes. Ta gelkammeret med gelen ut av elektroforesekaret og gå videre til farging av gelen for å synliggjøre DNA.

12.

