

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА „ПРОВЕДЕННЯ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОГО РОЗДІЛЕННЯ ДНК В АГАРОЗНОМУ ГЕЛІ”

При підготовці презентації використана інформація з сайтів відповідних фірм виробників продукції для проведення електрофорезу та пробопідготовки нуклеїнових кислот („Invitrogen”, „Thermoscientific”, „Fermentas”)

Буферні розчини для підготовки проб ДНК до електрофорезу в агарозному гелі:

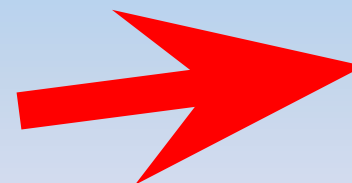
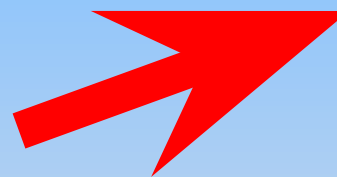
6X Loading Dye

Компонент	Концентрація
Трис-HCl	10 mM
Ксилен ціанол	0,03%
Бромфеноловий синій	0,03%
Гліцерол	60%
ЕДТА	60 mM

Xylene cyanol FF:

TAE: 4160 bp

TBE: 3030 bp



Bromophenol blue:

TAE: 370 bp

TBE: 220 bp

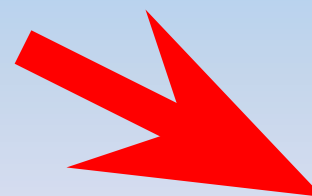
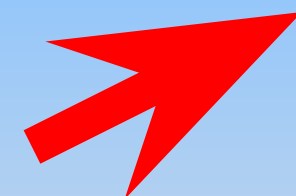


Буферні розчини для підготовки проб ДНК до електрофорезу в агарозному гелі:

6X Orange Loading Dye

Компонент	Концентрація
Трис-HCl	10 mM
Ксилен ціанол	0,03%
Orange G	0,15%
Гліцерол	60%
ЕДТА	60 mM

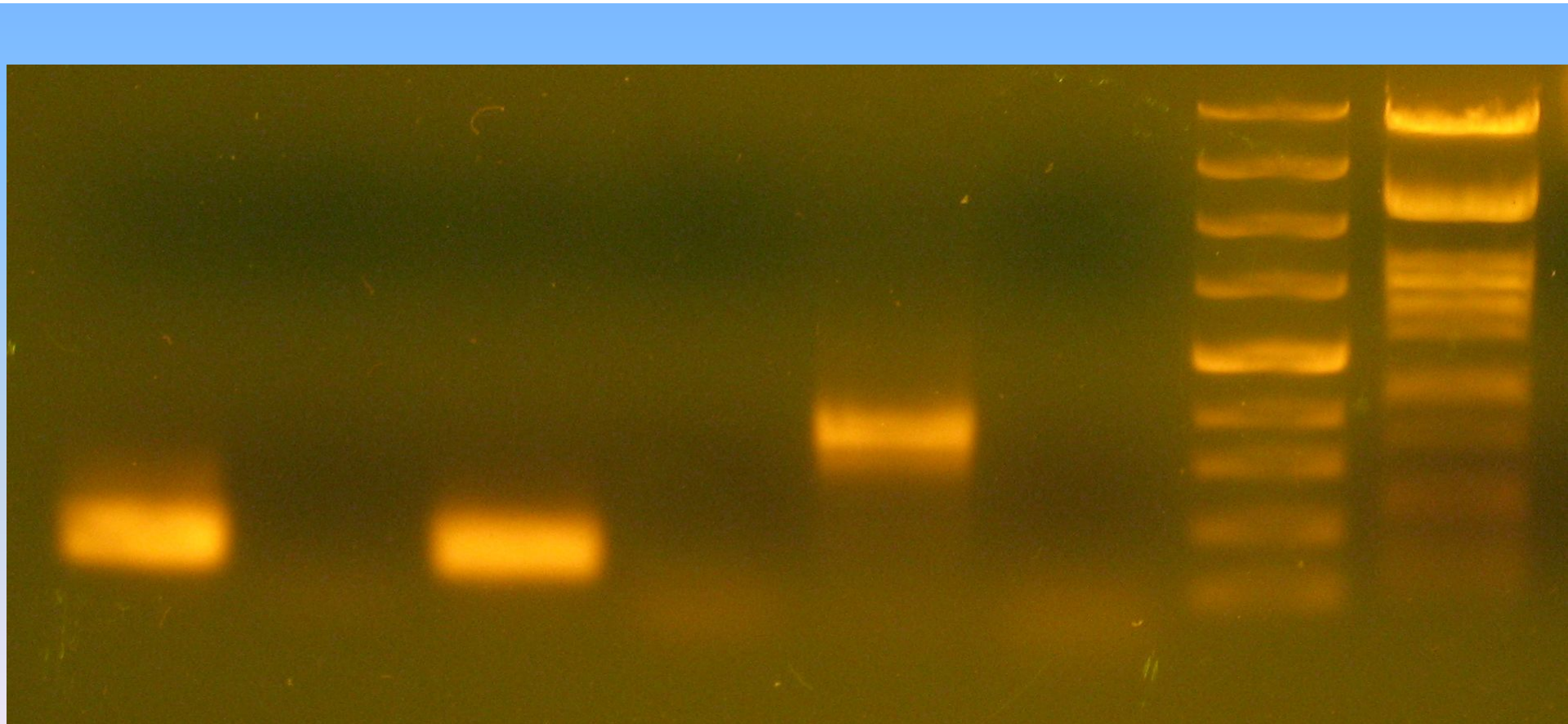
Xylene cyanol FF:
TAE: 4160 bp
TBE: 3030 bp



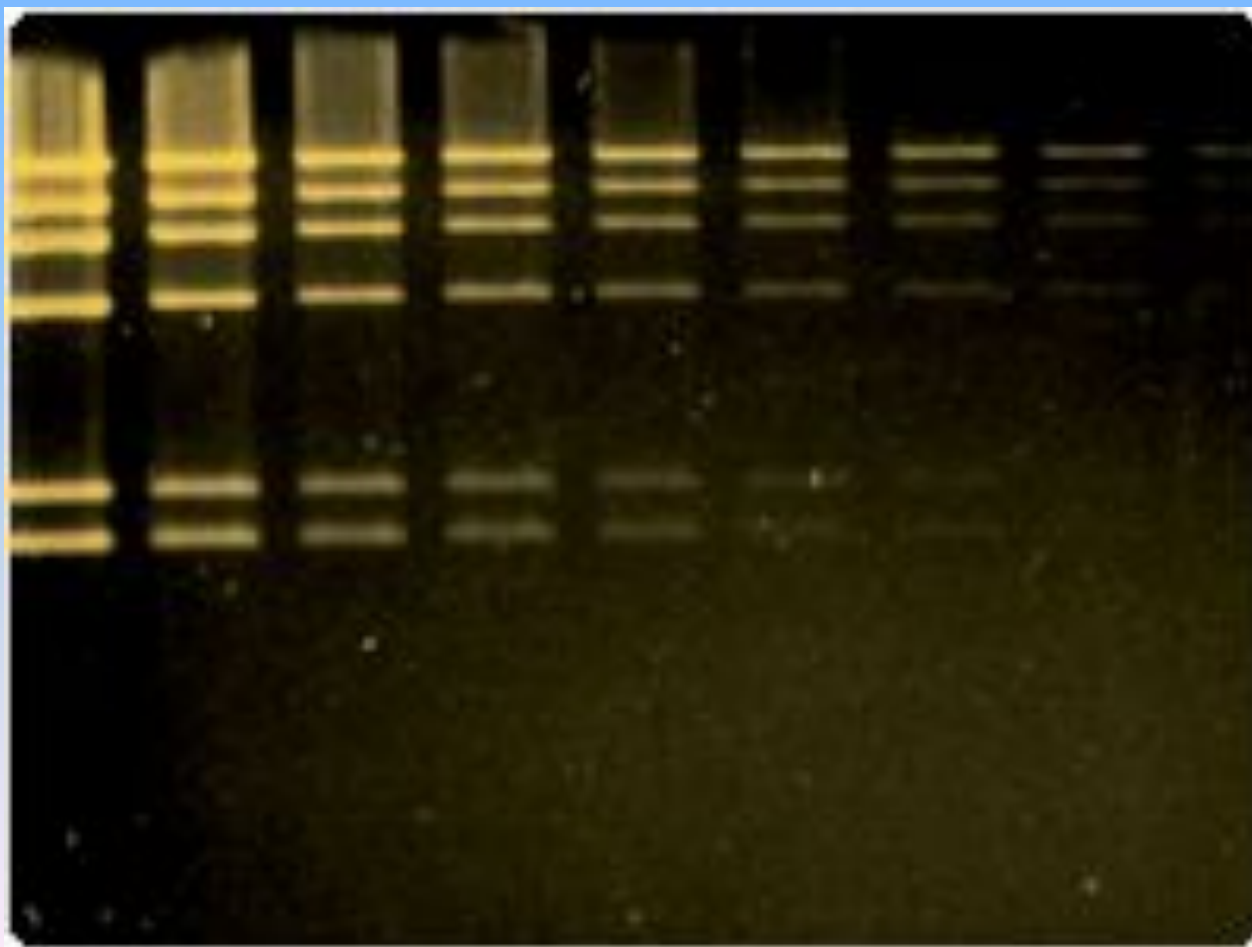
Orange G:
TAE/TBE: <50 bp



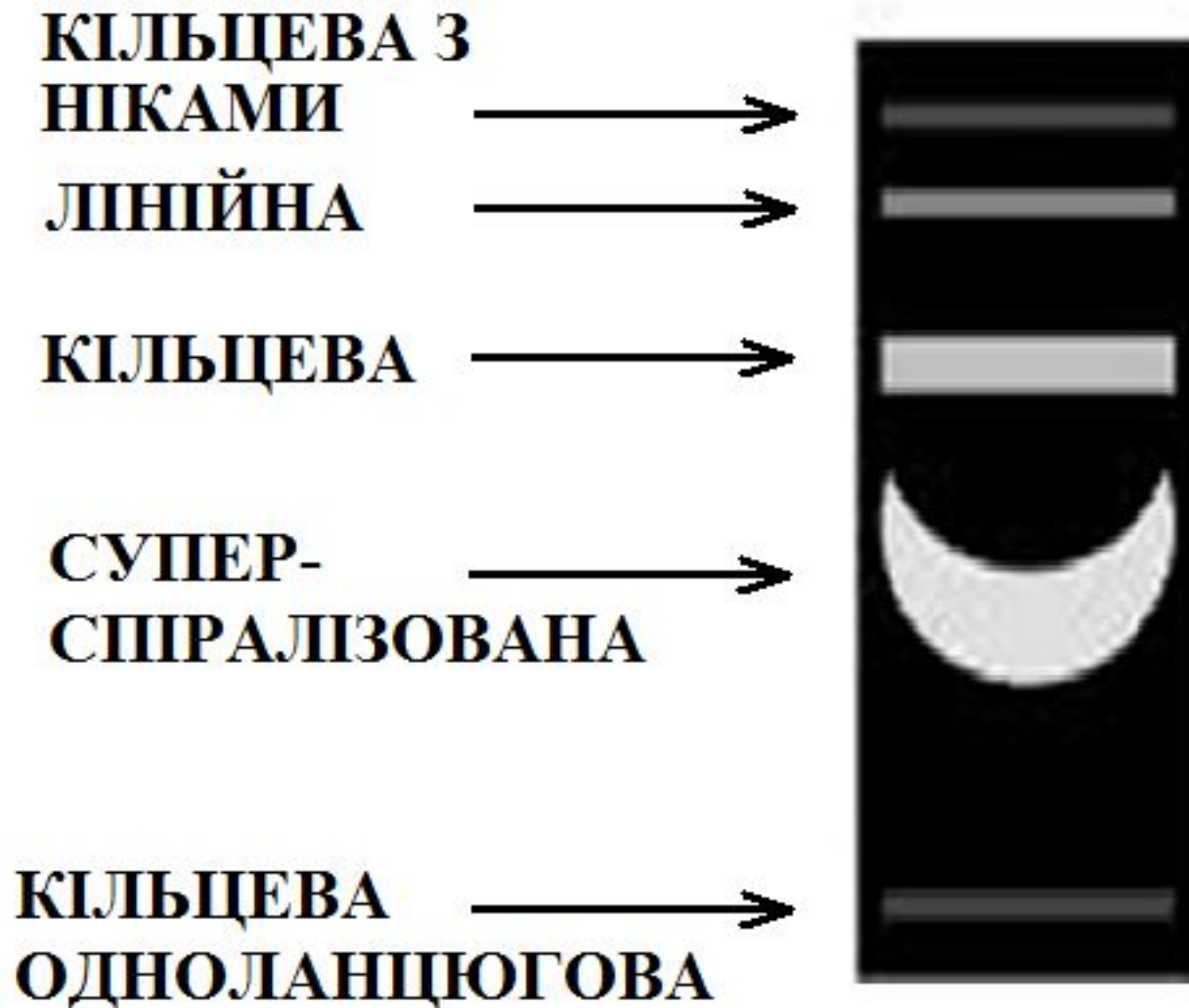
**Використання барвника етидію бромистого. Недоліки
– високий показник фонової флюоресценції і
ТОКСИЧНІСТЬ**



Використання барвника SYBR® Gold для візуалізації ДНК в гелі . Переваги барвників на основі SYBR® (SYBR® Green I, SYBR® Green II, and SYBR® Safe) – висока чутливість, нижчий показник фонові флюоресценції і токсичності в порівнянні з етидієм бромистим



Рухливість різних форм кільцевих ДНК в агарозному гелі



Рухливість різних форм кільцевих ДНК в агарозному гелі

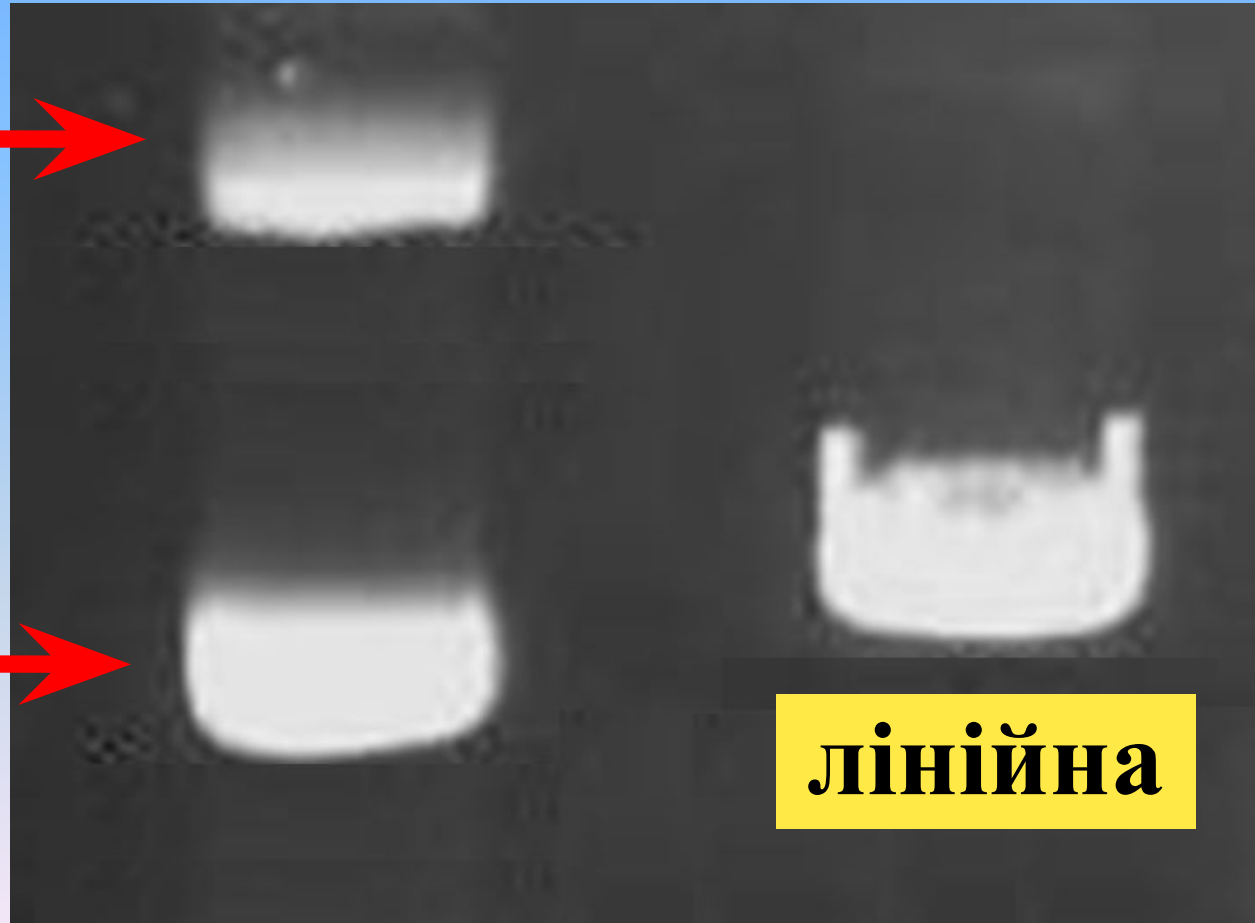
кільцева
з ніками



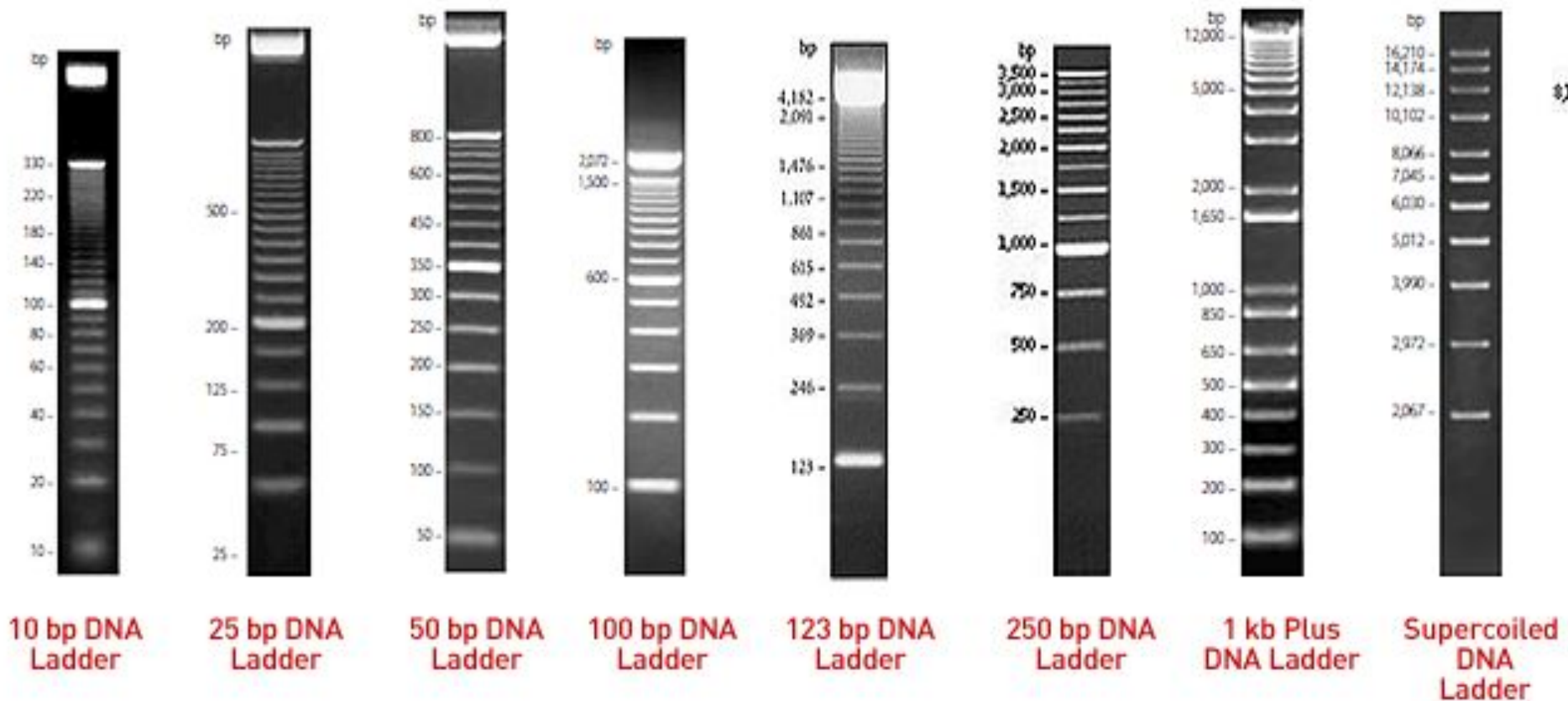
супер-
спіралі-
зована



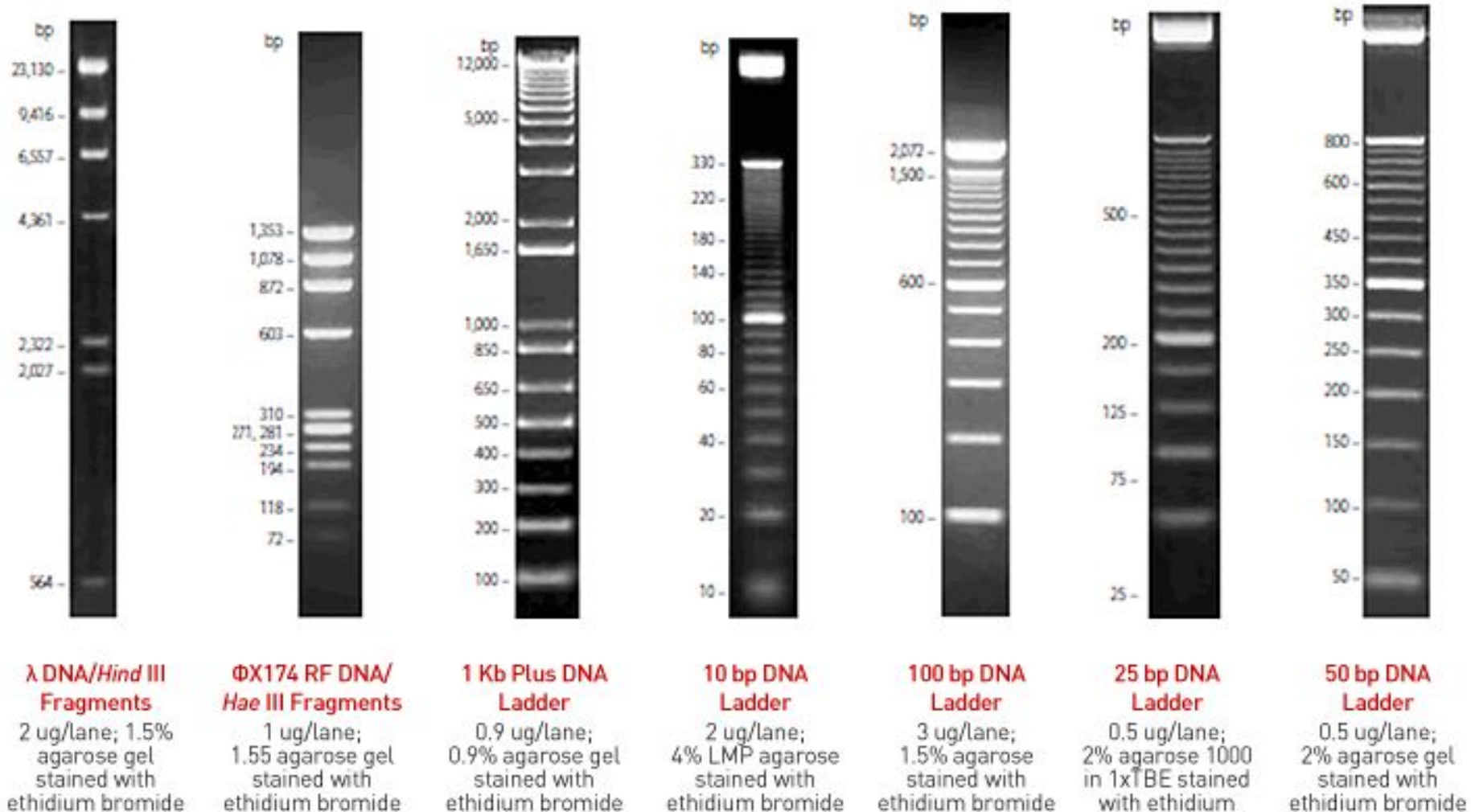
лінійна

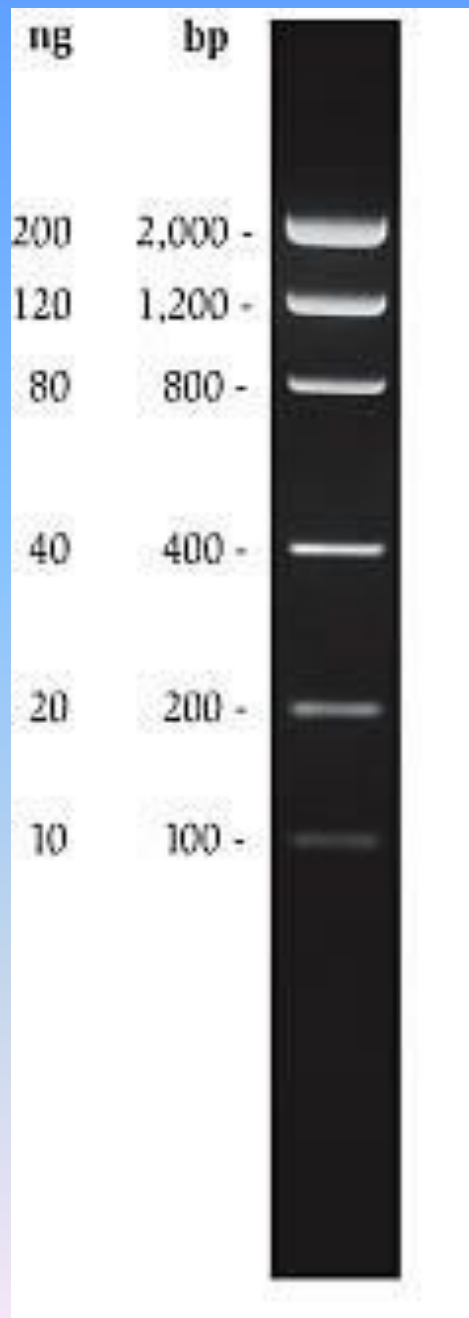


Використання різних маркерів молекулярної маси ДНК

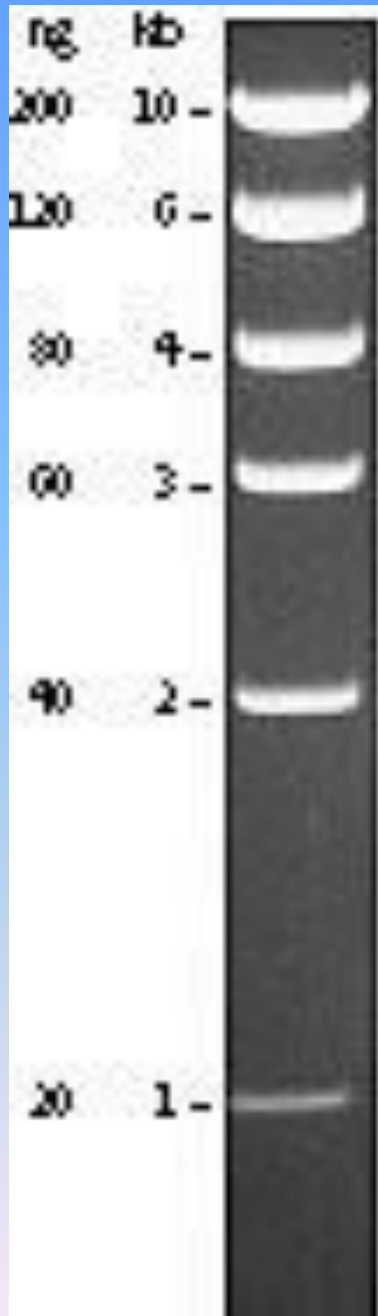


Використання різних маркерів молекулярної маси ДНК



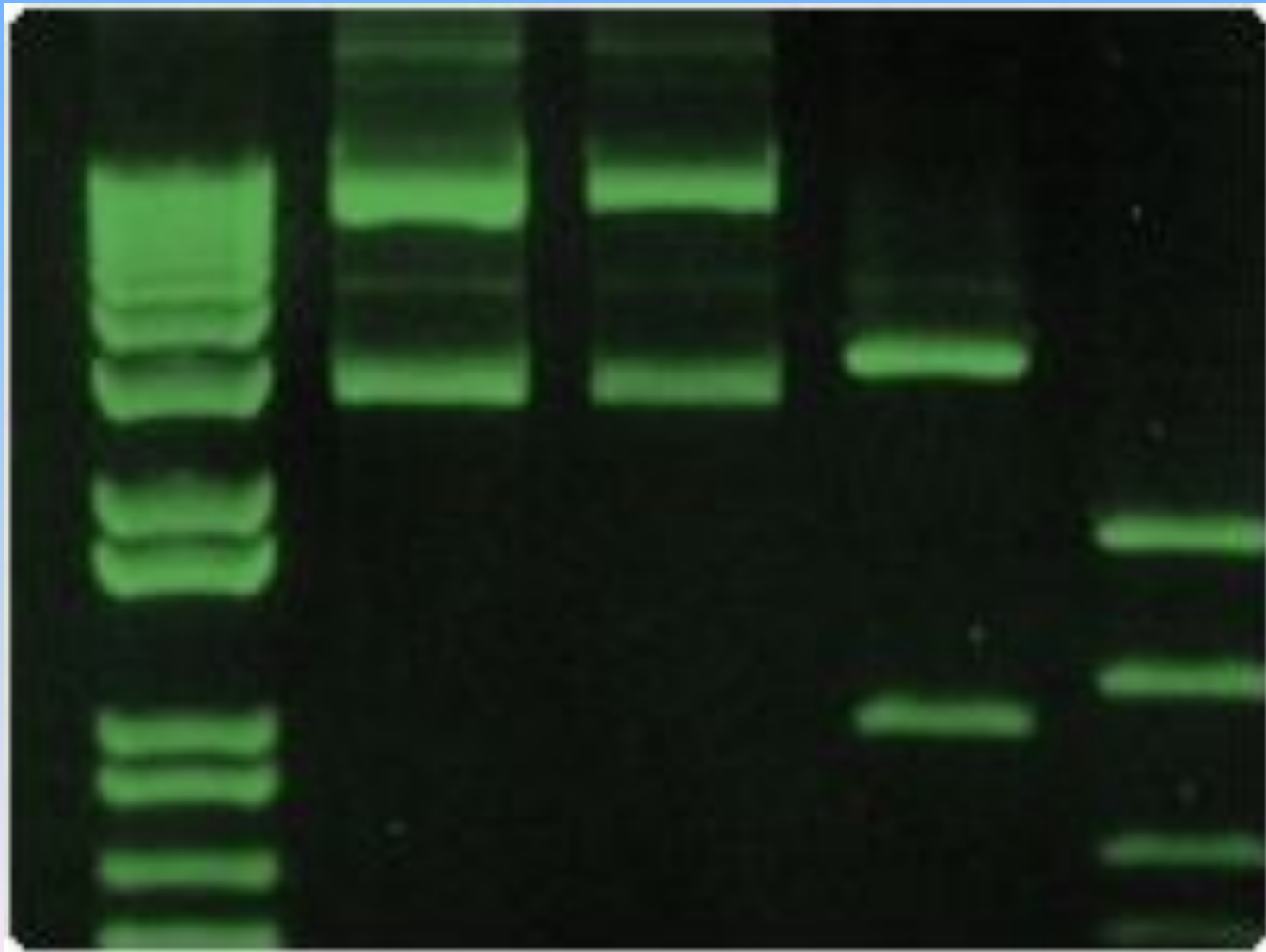


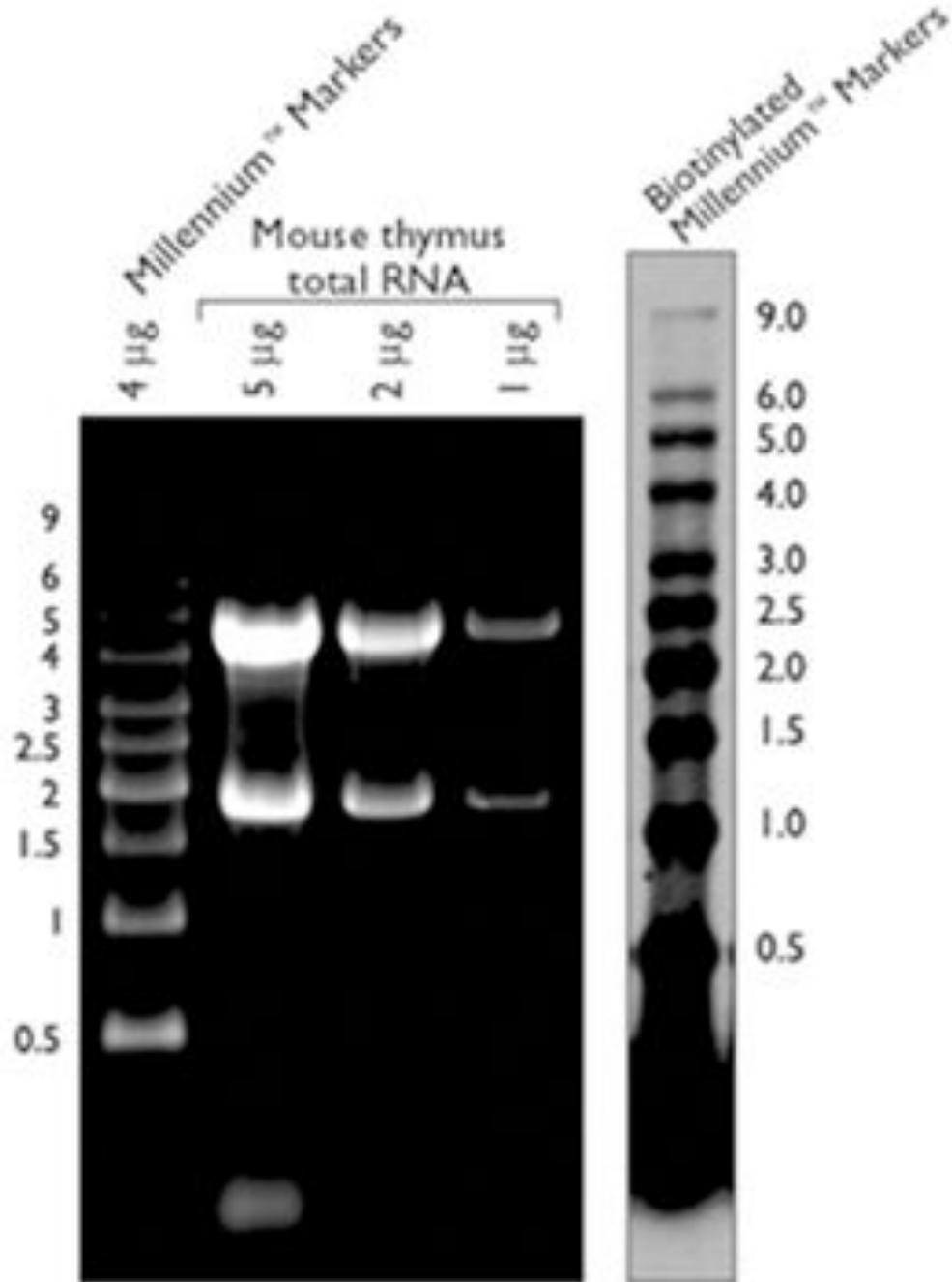
**Low DNA Mass Ladder
(patent pending) фірми
Fermentas для
визначення маси
окремих фрагментів
ДНК. В окремих
полосах ДНК
міститься 200, 120, 80,
40, 20, і 10 ng (загалом
470 ng) ДНК,
відповідно.**



**High DNA Mass Ladder
(patent pending) фірми
Fermentas для
визначення маси
окремих фрагментів
ДНК. В окремих
полосах ДНК
міститься 200, 120, 80,
40, 20, і 10 ng (загалом
520 ng) ДНК,
відповідно.**

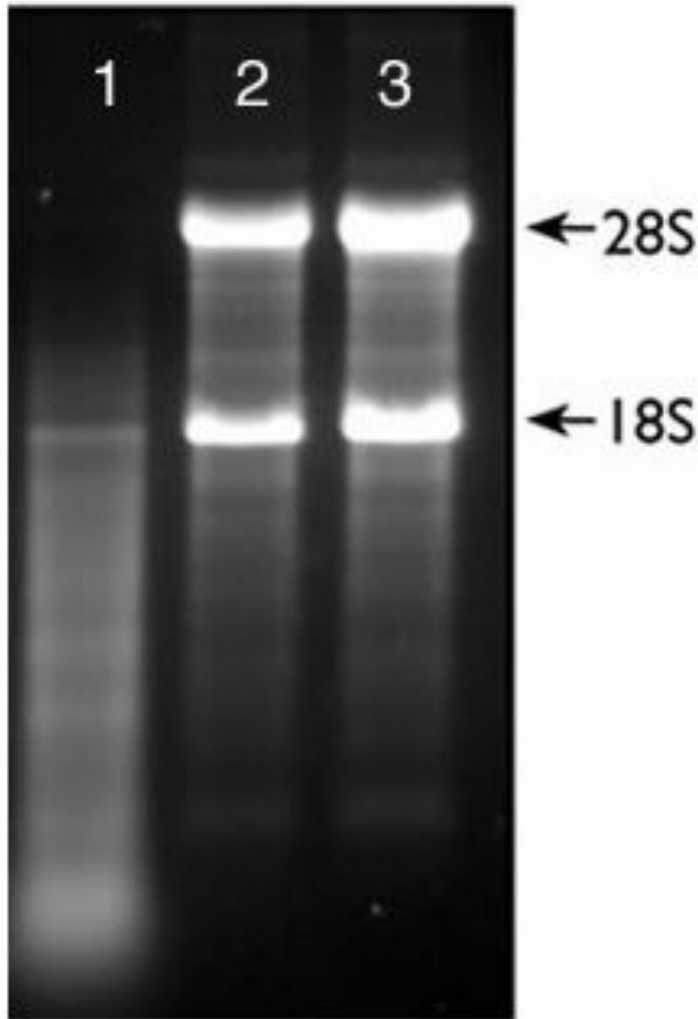
Використання барвника SYBR® Green I для візуалізації РНК в гелі





**Використання
маркерів
молекулярної
маси РНК
Ambion®
Millennium™
(діапазон мас 0.5,
1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4,
5, 6, і 9 kb) в
методиці
Northern blotting.**

Електрофорез сумарної РНК клітини

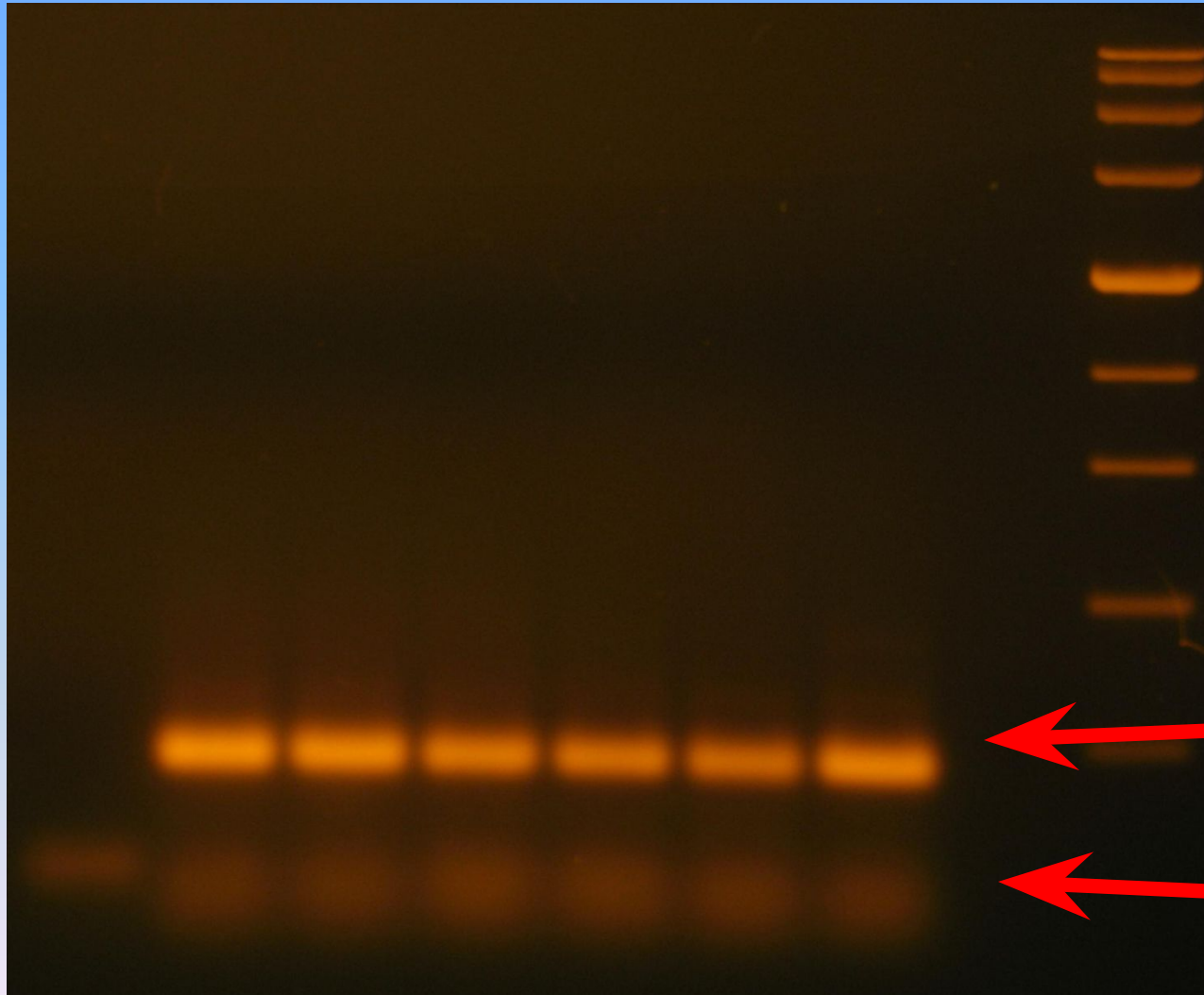


Доріжки:

**1 – невдало
виділена
сумарна РНК**

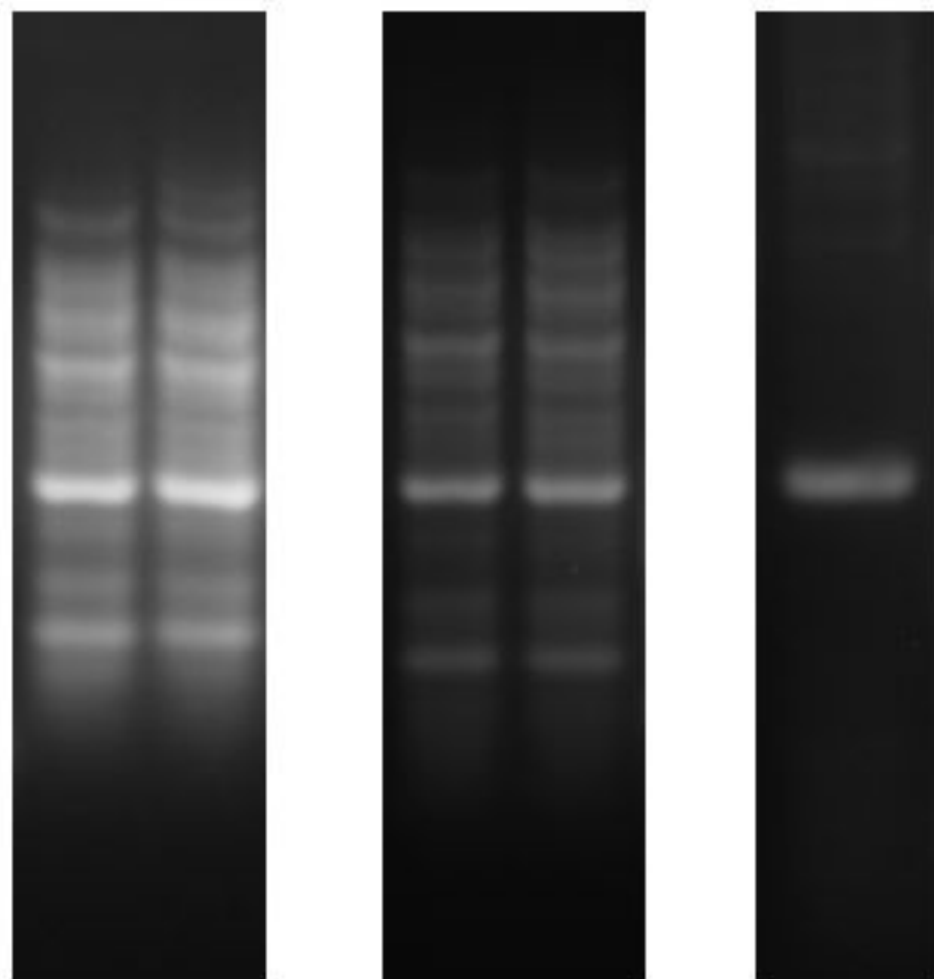
**2, 3 – сумарна
РНК виділена за
оптимальних
умов**

Електрофоретичне розділення після ПЛР-ампліфікації



продукт

праймери

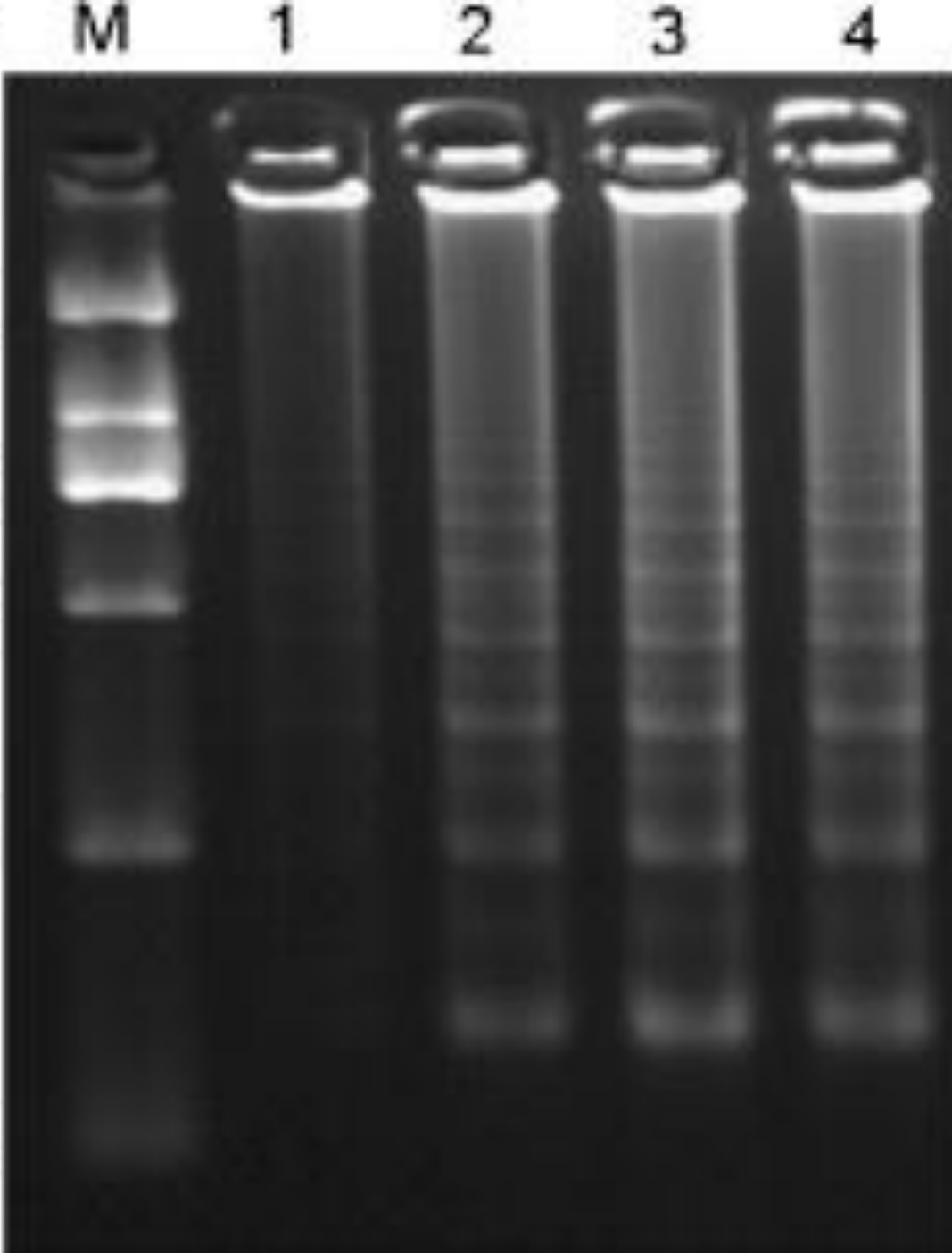


57°C

60°C

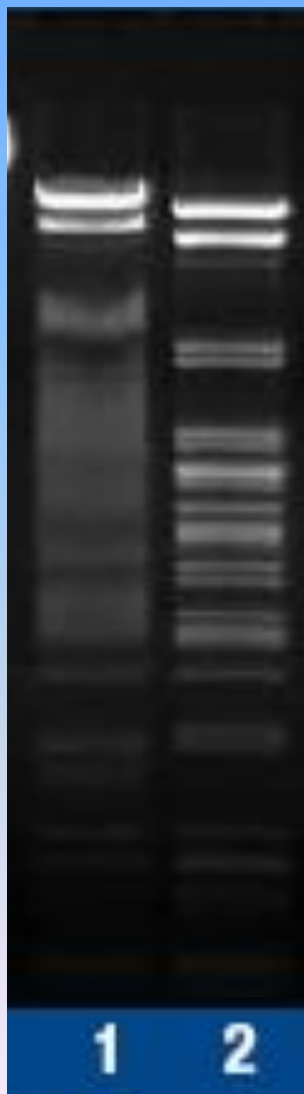
62°C

**Вплив
температури
випалу на появу
неспецифічних
продуктів ПЛР**



**Труднощі
форезу:
залишки ДНК
в лунках і
нечіткі полоси**

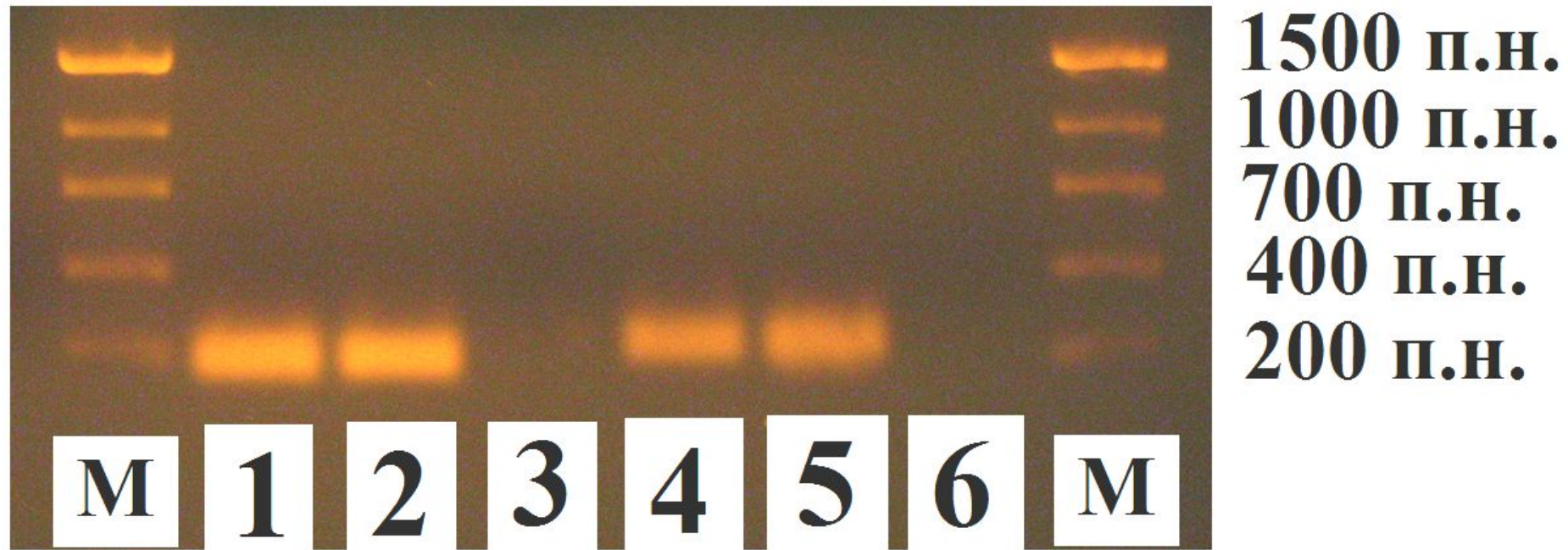
Вплив ДСН на розділення ДНК



1 – фаг лямбда після рестрикції TcoI (не використовували ДСН);

1 – фаг лямбда після рестрикції TcoI (використовували ДСН);

Аналіз ампліфікації позитивних контролів з лабораторної роботи №1



Доріжки:

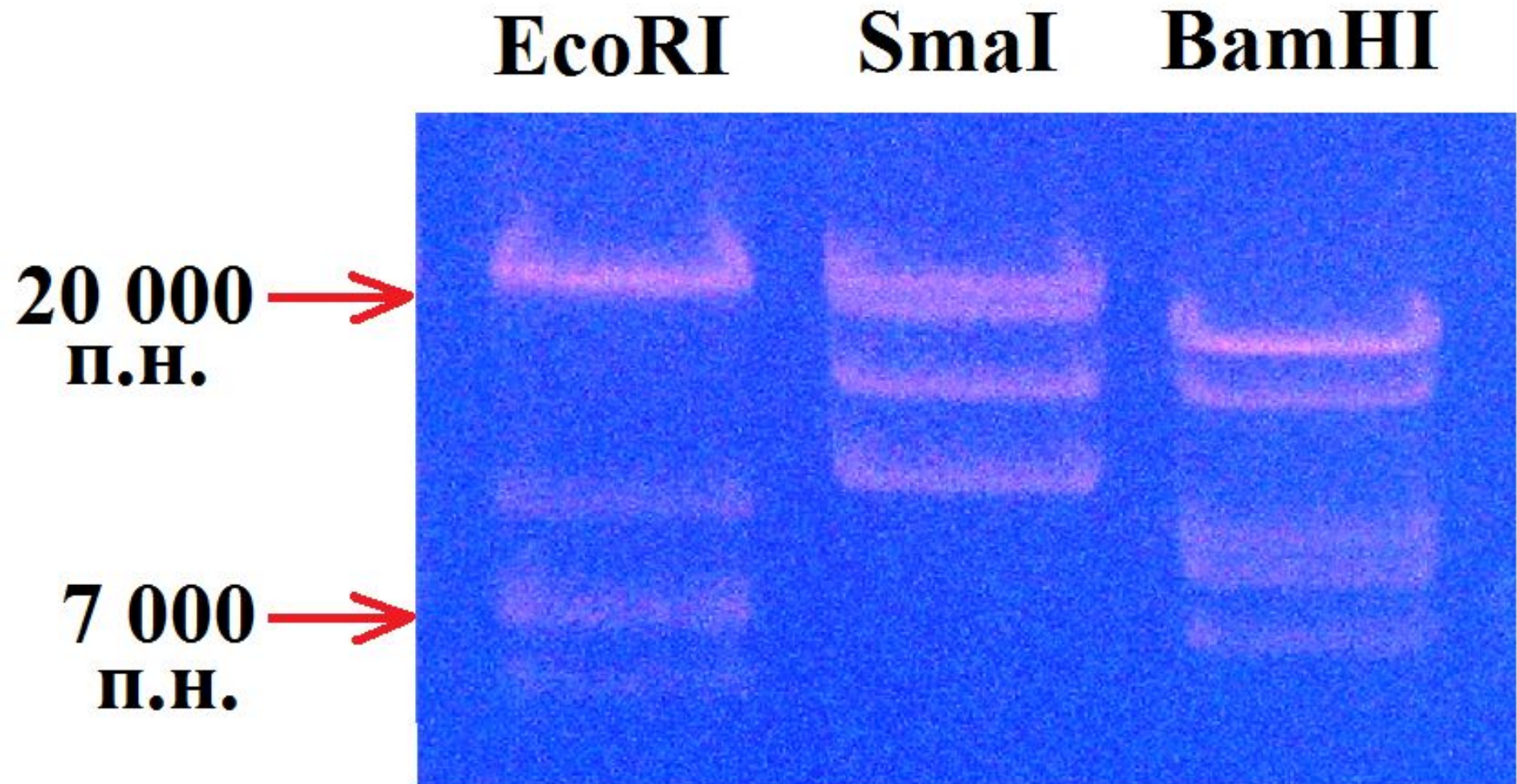
1, 2, 3 – *Toxoplasma gondii* : 1, 2 – позитивний контроль (187 п.н.),
3 – негативний контроль;

4, 5, 6 – *Trichomonas vaginalis*: 4, 5 – позитивний контроль (240 п.
н.), 6 – негативний контроль.

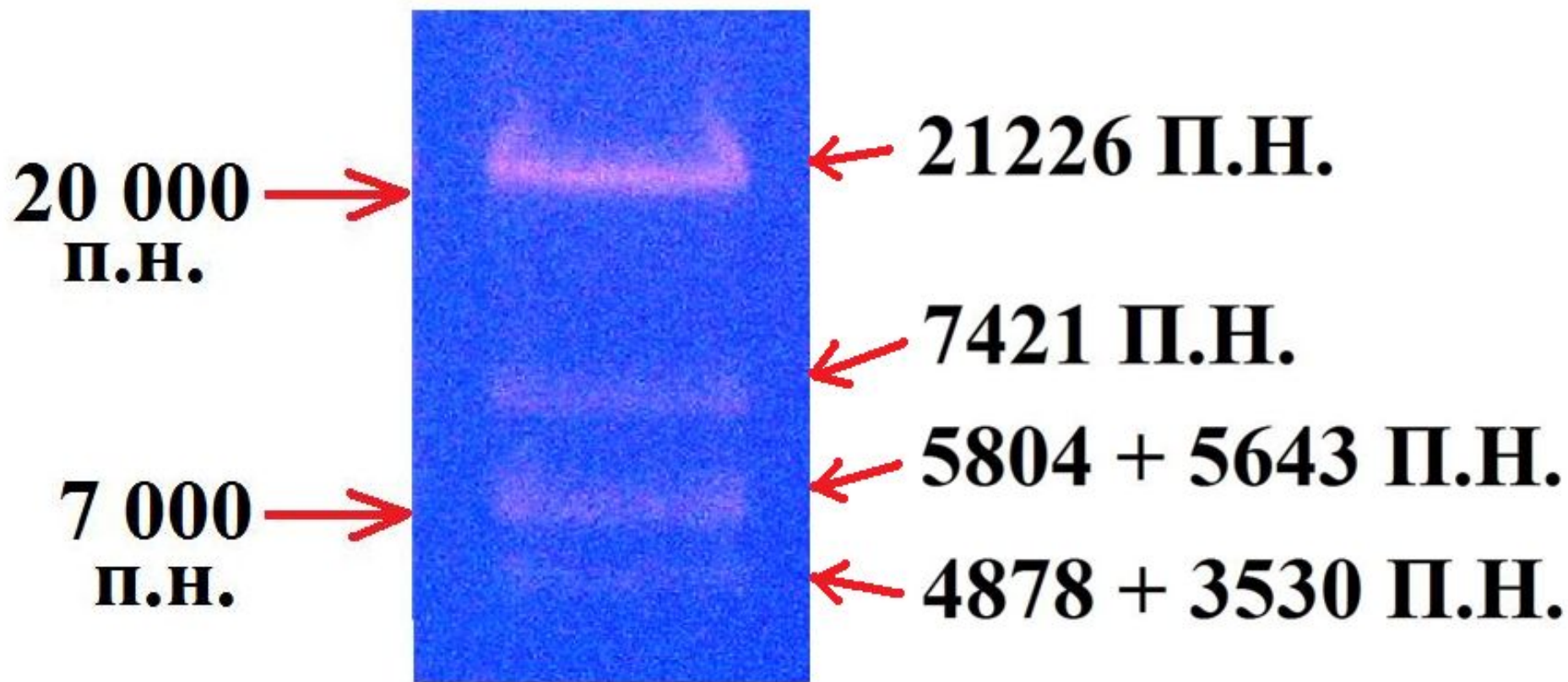
Аналіз продуктів рестрикції бактеріофага λ з лабораторної роботи №2

Рестриктаза	Довжини продуктів рестрикції (пари нуклеотидів)						К-ть продуктів
	1	2	3	4	5	6	
SmaI	19397	12220	8271	8614			4
BamHI	5505	5626	6527	6770	7233	16841	6
EcoRI	3530	4878	5643	5804	7421	21226	6

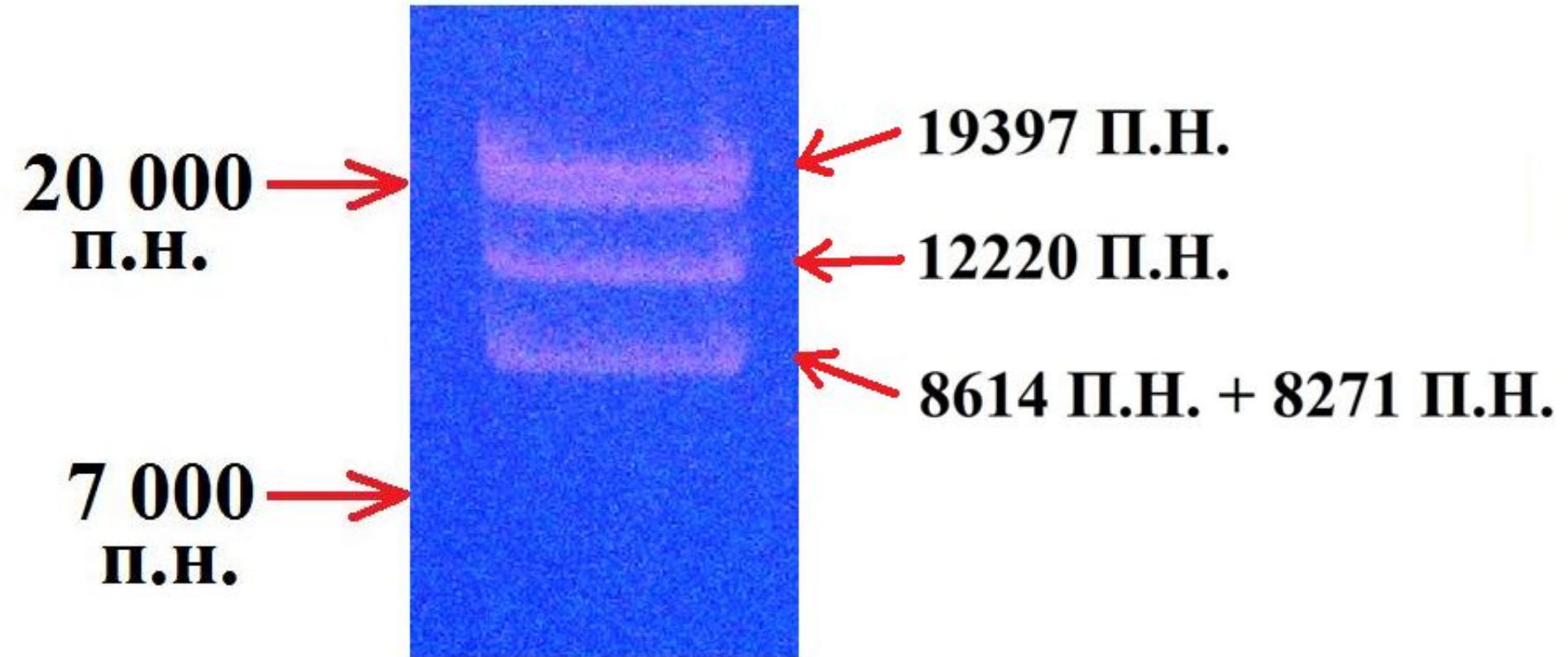
Аналіз продуктів розмірів продуктів рестрикції в лабораторній роботі



Аналіз продуктів рестрикції EcoRI



Аналіз продуктів рестрикції SmaI



Аналіз продуктів рестрикції BamHI

