

**PROBLEME AVANSATE DE GENETICA ȘI
BIOTEHNOLOGIA PLANTELOR**

PL 4

**ELECTROFOREZA ÎN GEL DE AGAROZĂ
ÎN SISTEM SUBMERS ORIZONTAL**

Electroforeza reprezintă una dintre cele mai eficiente metode utilizate în biologia moleculară.

Tehnica se folosește pentru determinarea purității ADN-ului sau ARN-ului, la verificarea existenței produșilor rezultați în urma PCR-ului sau la analiza fragmentelor rezultate după clivarea enzimatică (cu ajutorul enzimelor de restricție) a ADN-ului.

Probele de ADN sunt plasate într-o **matrița solidă** (gel de agaroză), moleculele migrând prin gel sub influența unui câmp electric extern.

Sub influența unui câmp electric extern, moleculele se vor alinia la direcția câmpului electric și vor migra spre anod printr-o mișcare dirijată (acizii nucleici sunt încărcăți negativ datorită prezenței grupărilor fosfat și migrează spre electrodul încărcat pozitiv).

Fragmentele se separă sub forma unor benzi electroforetice

Mobilitatea unui fragment de ADN este invers proporțională cu masa moleculă și este influențată de: concentrația de agaroză, conformația moleculei de ADN (monocatenar, bicatenar sau superrăsucit), prezența compusului fluorescent în gel, tamponul utilizat, tipul de agaroză și voltajul aplicat.

Mărimea fragmentelor este exprimată în: "nucleotide", perechi de baze" sau "kb"-pentru o mie de perechi de baze

Avantajele tehnicii

- gradul mare de rezoluție, specificitate și sensibilitate
- gradul mare de reproductibilitate

Materialele necesare:

- aparat de electroforeză și o sursa de electricitate;
- taviță pentru gel;
- pieptani;
- tampon colorare (10mM Tris-HCl, pH=7,6, 0.03% bromfenolblue, 0.03% cianolxilen, 60% glicerol, 60mM EDTA);
- tampon electroforeză : TBE (Tris – borat 45 mM, 1 mM EDTA),
- bromură de etidiu 10mg/ml;
- agaroză
- transiluminator UV.

O tehnică frecvent folosită în biologia moleculară este migrarea moleculelor de acizi nucleici în gel de agaroză în câmp electric.

Electoforeza în gel de agaroză este o metodă standard folosită în separarea, purificarea și identificarea moleculelor de ADN, dar și pentru verificarea integrității ADN-ului genomic, precum și estimarea gradului de contaminare cu ARN .

Principiul metodei: la PH alcalin sau neutru, moleculele de acizi (au sarcină negativă) migrează într-un câmp electric, spre anod (+)

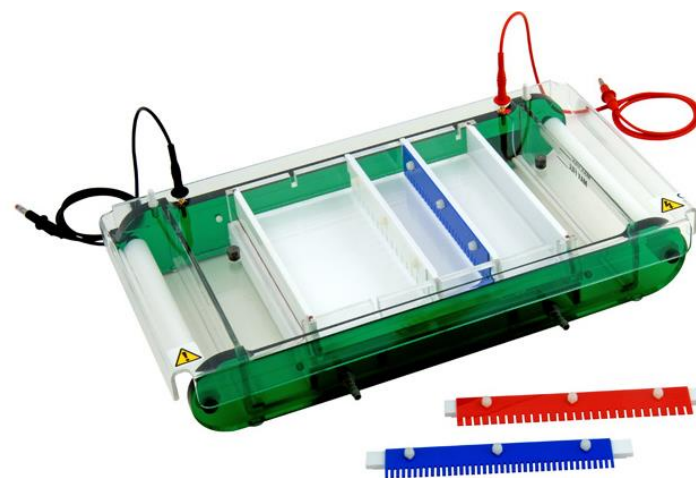
Analiza electroforetică a extractelor ADN a fost realizată prin efectuarea de electroforeze în geluri de agaroză 1% în tampon TBE (Tris-borat) 1X (pH=8,3). Probele (8 μ l) au fost amestecate cu 2 μ l albastru de bromfenol (BFE) și pipetate în godeuri. În tamponul de migrare (TBE), preparat din soluție stoc de 10X, s-a adăugat soluție de bromură de etidium până la concentrația finală de 0.5 μ g/ml, pentru colorarea gelului și evidențierea acizilor nucleici. Voltajul aplicat a fost de 70V/60min.

Pentru evidențierea produșilor de amplificare ISSR a fost aplicat procedeul de mai sus cu unele modificări: concentrația de agaroză în gel a fost de 2%, iar pentru stabilirea dimensiunilor fragmentelor de ADN, s-a folosit 2 μ l marker de greutate Gene Ruler 100pb (*Fermentas*)

Vizualizarea izolatelor ADN și a produșilor de amplificare ISSR s-a făcut cu UVP 3UV BenchTop Transilluminator ($\lambda=312$ nm), iar fotografierea s-a realizat cu un aparat Panasonic Lumix DMC-LS75.

Soluții de lucru: soluție stoc TBE 10X pH=8.0-8.5 (Tris 0.089M, acid boric 0.089M, EDTA 0.002); BFE (10mM Tris-HCl, pH=7,6, 0.03% bromfenolblue, 0.03% cianolxilen, 60% glicerol, 60mM EDTA); soluție stoc de bromură de etidium 10mg/ml; agaroză (*Sea Kem Le Agarose*).

CUVE ȘI ACCESORII

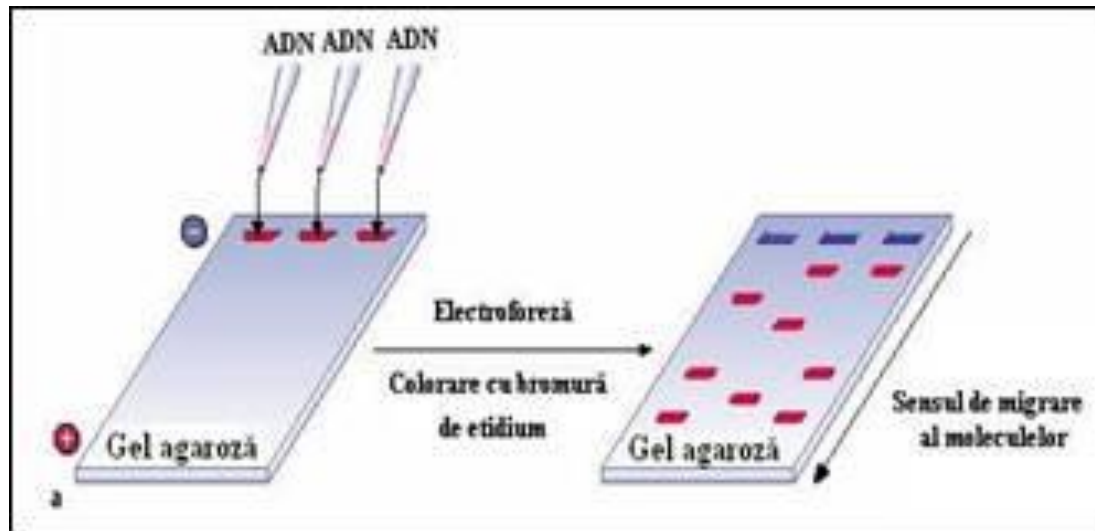
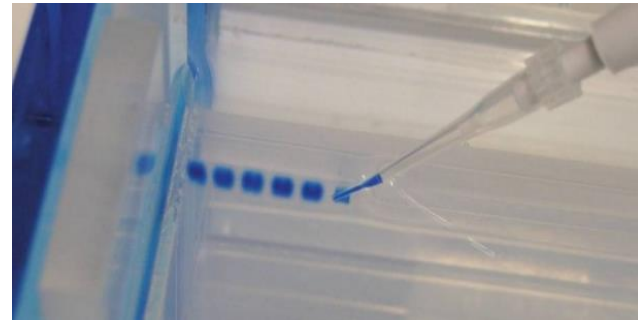
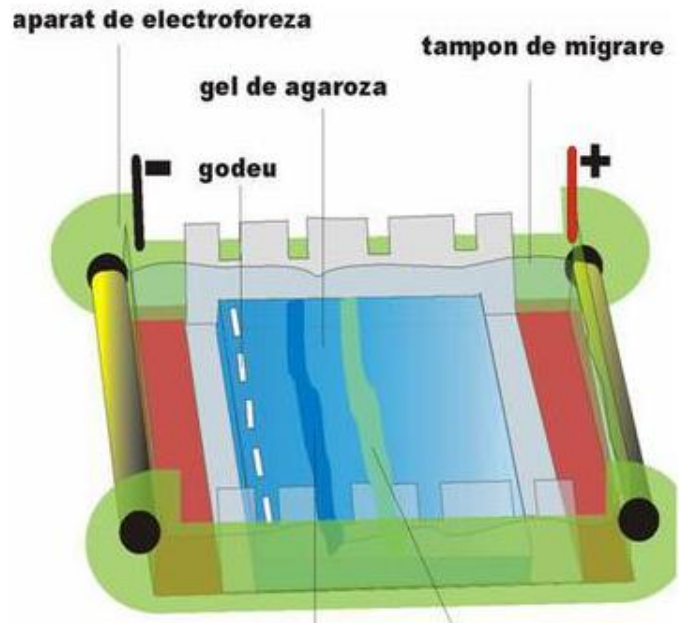


SURSE de curent

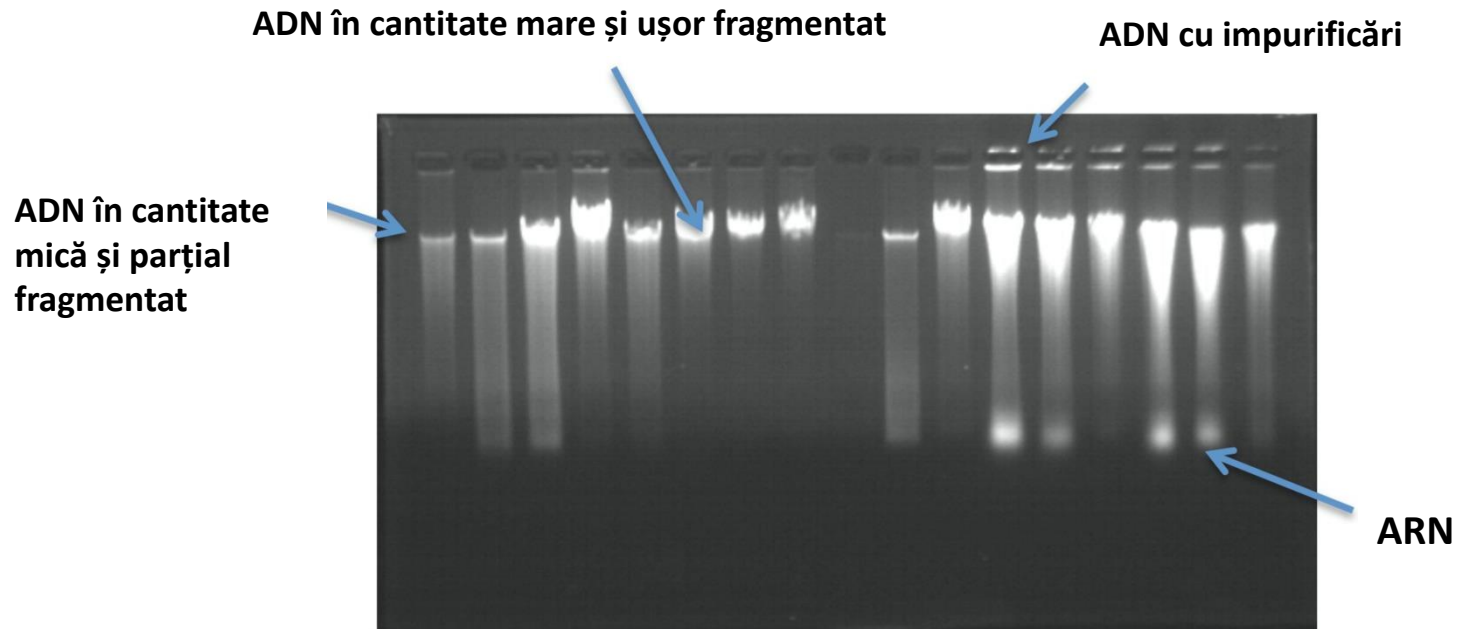


TRANSILUMINATOR UV

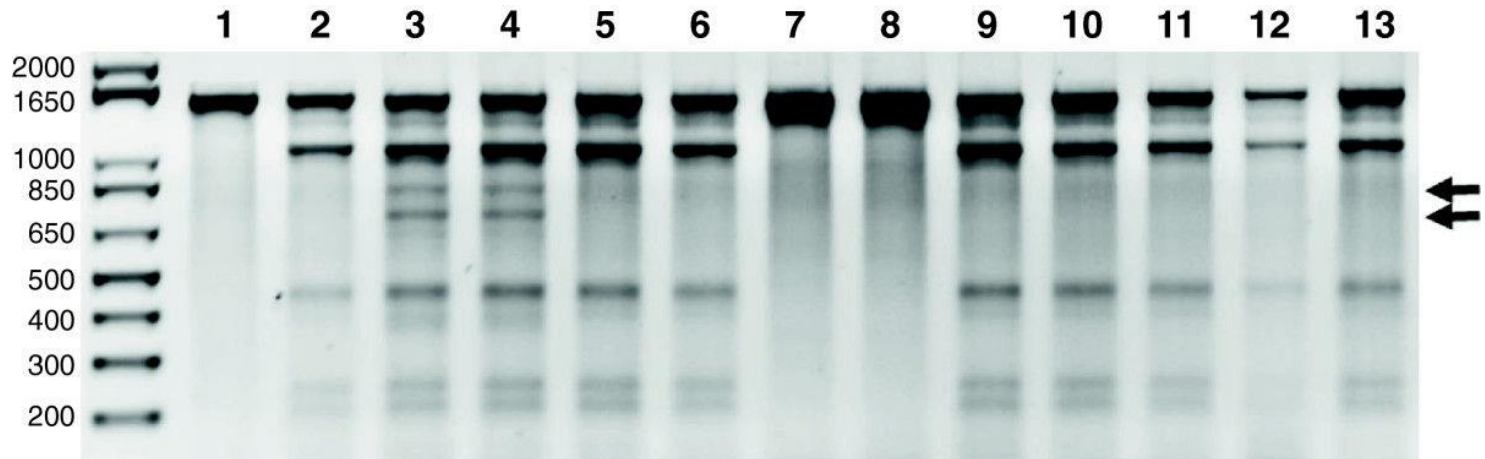




Electroforeza în gel de agaroză a ADN genomic izolat din țesut vegetal



Electroforeza în geal de agaroză a unor produși PCR



Determinarea mărimii fragmentelor se face prin compararea cu “DNA-ladders” ce conțin fragmente liniare de ADN, de lungimi cunoscute

**Exemple de
markeri de greutate**

