**Тема: Расчет параметров электрофореза нуклеиновых кислот.**

**Цель:** Расчет параметров электрофореза. Влияние различных факторов на электрофоретическую подвижность нуклеиновых кислот в агарозном геле.

Анализ фактического материала, оформление полученных данных.

**Краткое содержание темы.**

**Выбор % геля**

***Разделение линейных молекул***

Диапазон нормального разделения линейных dsDNA молекул для гелей с различной концентрацией агарозы:

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| % агарозы | 0.3 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 1.2 | 1.5 | 2.0 |
| Размер DNA [kbp] | 5-60 | 1-30 | 1-20 | 0.8-12 | 0.6-10 | 0.5-8 | 0.5-7 | 0.4-6 | 0.2-3 | 0.1-2 |

Меньший предел определяется (в основном) диффузией полосы в геле. Т.е. в гелях с низкой концентрацией агарозы мелкие фрагменты вполне разделяются, но полосы не четкие.

Верхний предел сильно зависит от напряженности поля, при которой проводится форез. Чем меньше напряженность поля, тем более длинные молекулы можно эффективно разделить.

***Разделение суперскрученных и кольцевых молекул***

К сожалению относительная подвижность линейных и кольцевых молекул зависит от условий фореза: % геля, скорость фореза (в частности, это означает, что нельзя пользоваться линейным маркером для оценки размера кольцевых молекул).

Приведенная таблица дает некоторое представление о соотношении подвижностей при умеренной (~6V/cm) скорости фореза (в скобках - при более быстром разгоне):

|  |
| --- |
|  |

В присутствии 0.5 µg/ml EtBr разрешение релаксированной и суперскрученной pDNA увеличивается примерно в 20 раз при повышении ионной силы буфера до 4хТАЕ. Того же увеличения можно добиться понижая концентрацию EtBr.

***Одноцепочечная DNA***

На 1% агарозном форезе ssDNA бежит чуть быстрее (~10%), чем dsDNA того же размера. ssDNA окрашивается EtBr заметно слабее, чем ds (разница в ~4-5 раз). Tо есть, чтобы полосы имели одинаковую интенсивность окраски, требуется взять ~ в 5 раз больше ssDNA.

Чтобы разделить цепи, нужно либо непосредственно перед форезом прогреть ~1' 100oC, либо добавить к образцу NaOH до 0.1 М, 5-10' (NT или 37oC);

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Размер суперскруч. DNA [kbp] | Размер линейной DNA [kbp] для различных % агарозного геля | | | |
| 0.7% | 1% | 1.5% | 2% |
| 2 | 1.2 | 1.3 | 1.3 (1.6) | 1.5 (1.0) |
| 3 | 1.7 | 1.8 | 2 (2.4) | 2.9 (1.8) |
| 4 | 2.2 | 2.3 | 2.7 (3.7) | - |
| 5 | 2.7 | 2.9 | 3.5 (5.5) | - |
| 6 | 3.2 | 3.5 | 5 (8.5) | - |
| 7 | 3.9 | 4.2 | 8.5 (>12) | - |
| 8 | 4.4 | 5.0 | >12 | - |
| 9 | 5.1 | 5.9 | - | - |
| 10 | 5.8 | 6.8 | - | - |
| 12 | 7 | 8.7 | - | - |

**Напряжённость поля**

При оценке напряженности поля для горизонтального фореза принято пренебрегать конкретной геометрией камеры и измерять расстояние непосредственно между электродами.

На рисунке показана схема форезов, при разном напряжении. Форезы проводились разное время, так, чтобы 0.5kb фрагмент прошел одинаковое расстояние. Видно, что проведение фореза при высоком напряжении эквивалентно уменьшению длины геля.

Разумный компромисс между скоростью и качеством фореза для высококачественных или препаративных форезов: ~2V/cm(можно меньше для ON форезов). Для аналитических форезов приемлемое качество сохраняется до ~6V/cm.

DNA особенно легко теряет EtBr при повышенной температуре (что обычно случается, если гонять форезы при высоком напряжении).

EtBr при форезе движется от (+) к (-). Если хочется, чтобы он не уходил из геля, лучше ввести его и в форезный буфер.

**Количество DNA, которое можно наносить на дорожку**

Нижний предел определяется используемым методом детекции. Если применяется окрашивание EtBr, то не стоит надеяться увидеть <10ng на 5mm полоску.

Верхний предел: слишком большое количество DNA на дорожке приводит к двум неприятным эффектам:

* 1. изменению подвижности полосы в геле (идёт быстрее). Так что не надо сразу паниковать, когда, например, слишком большое количество pDNA идёт быстрее, чем разбавленная исходная плазмида. (к такому же эффекту может привести и слишком большое количество RNA в препарате pDNA).
  2. при визуальной или при денситометрической оценке количества DNA получаются заниженные оценки (точность совсем низкая, начиная приблизительно с 0.5 µg на 5mm дорожку). Оптимальный диапазон для денситометрического определения: 0.02-0.15 µg на полоску.