



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

-----

### **Mini-Vertikalios elektroforezės ROTH naudojimo instrukcija**

#### **Sauga**

1. Prieš pradėdami naudoti įrangą atidžiai perskaitykite instrukcijas.
2. Prieš nuimdami apsauginį dangtį visada atjunkite elektroforezės įrangą nuo srovės šaltinio: pirmiausiai išjunkite srovę, tik tada atjunkite laidus.
3. Nenaudokite didesnės srovės ar įtampos nei nurodyta instrukcijose (žr. lentelę 1).
4. Akrilamidas yra lakus, koncentruotas neurotoksinas, kuris manoma gali būti kancerogenas. Net polimerizavęsis akrilamidas savo sudėtyje turi nepolimerizuoto monomero liekanų. Todėl dirbdami su akrilamidu visada dėvėkite apsauginius rūbus ir mūvėkite pirštines.
5. Pripildydami elektroforezės kamerą buferiu neviršykite nurodyto tūrio.
6. Vykstant elektroforezei nejudinkite įrangos.
7. Elektroforezės metu nedideli kiekiai įvairių dujų susidaro ties elektrodais. Susidariusių dujų prigimtis priklauso nuo naudojamo buferio. Norėdami išsklaidyti dujas elektroforezę atlikite vėdinamoje aplinkoje.

#### **Įrangos priežiūra**

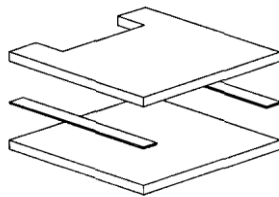
1. Prietaiso valymui naudokite distiliuotą vandenį.
2. Akrilinis plastikas, iš kurio padarytos prietaiso dalys yra neatsparus aromatiniams ir halogenintiems angliavandeniliams, ketonams, esteriams, alkoholiams (>25 %) ir rūgštims (>25 %), todėl šių medžiagų negalima naudoti. Taip pat valymui nenaudokite šveitimo kremų.
3. Prieš naudojimą prietaiso dalis išdžiovinkite arba nusausinkite.
4. Prieš pirmą naudojimą patikrinkite ar prietaiso kamera yra sandari. Tam pripildykite kamerą distiliuotu vandeniu iki nurodytos maksimalios žymos ir stebėkite ar vanduo nesisunkia. Jei pastebite, kad vanduo sunkiasi nesistenkite prietaiso sutaisyti patys, bet susisieki su Carl Roth GmbH & Co. KG (+49-0721-5606-172)
5. Apsaugai keičiami platinos elektrotai yra uždengti, tačiau valydami prietaisą nenaudokite žepetėlių, kad nepažeistumėte elektrodų.
6. Prieš naudojimą ar palikdami prietaisą nenaudojamą ilgesniam laikui įsitikinkite, kad jungtys yra švarios ir sausos.

### **Gelio plokštelių paruošimas**

1. Nuplaukite stiklines plokšteles, tarpines ir šukas švelniu detergentu. Jeigu reikia paruošti gelius, kuriems reikia ypač švirių paviršių (pvz. dideliems arba labia ploniems geliams, naudojant dažymą sidabru), galite plokšteles papildomai nuplauti etanoliu, acetonu ir vėl etanoliu.
2. Jei norite palengvinti plokštelių ir gelio atskyrimą, plokštelės galite hidrosilikoninti naudojant di-metildichlorohidrosilikono garus.
3. Rekomenduojama plokšteles liesti tik mėvint pirštines (pirštų antspaudai gali būti pašalinami acetonu).

### **Gelio plokštelių surinkimas**

1. Padėkite plokštelę ant švaraus lygaus paviršiaus, uždėkite tarpines, o ant viršaus – antrą stiklinę plokštelę su išpjova (Pav. 1).



*Pav. 1 Gelio plokštelių surinkimas.*

2. Atsukite elektroforezės modulio varžtus ir nuimkite tvirtinančias plokšteles. Patikrinkite, kad ant guminių tarpinių nebūtų purvo. Jei reikia, nuvalykite gumines tarpines švairiu, nepūkuotu skudurėliu.
3. Padėkite surinktas stiklines plokšteles ant elektroforezės modulio taip, kad stiklelis su išpjova būtų apačioje, o stiklinių plokštelių apačia būtų viename lygyje su elektroforezės modulio apačia. Uždėkite tvirtinačią plokštelę ant viršaus ir įsukite varžtus (bet nepriveržkite). Kitoje elektroforezės modulio pusėje įdėkite kitą stiklinių plokštelių komplektą arba kompensuojančią plastikinę plokštelę.
4. Surinktą elektroforezės modulį atsargiai pastatykite vertikaliai ir patikrinkite ar visų plokštelių apačia yra lygi. Jei reikia plokšteles palyginkite.
5. Priveržkite varžtus. Veržkite tolygiai, kad stiklas nesuskiltų.
6. Elektroforezės modulį pastatykite ant specialaus stovo, skirto gelių užpylimui. Pritvirtinkite elektroforezės modulį prie stovo pasukdami šonuose esančias rankenėles aukštyn.

### **Gelio užpylimas**

1. Norėdami gauti atsikartojančius rezultatus ir savo pačių saugumo labai gelius ruoškite naudodami komercinius koncentruotus akrilamido tirpalus (pvz. Rotiphorese<sup>®</sup>Gel 30 arba Rotiphorese<sup>®</sup>Gel 40). Akrilamido tirpalai turi būti laikomi vėsioje tamsioje vietoje (šaldytuve), tačiau užpilant gelį akrilamido tirpalas turi būti kambario temperatūros. Stenkitės, kad ant tirpalo nepatektų tiesioginiai saulės spinduliai ir, kad jis nebūtų kaitinamas.
2. Sumaišykite gelio komponentus jūsų darbo protokole nurodytais kiekiais, atidžiai sumaišykite. Pasistenkite, kad nesusidarytų burbulai.
3. Supilkite mišinį tarp stiklo plokštelių. Pasistenkite, kad nesusidarytų burbulai.
4. Jeigu norite paruošti dvisluksnį gelį (sudarytą ir koncentruojančio ir skiriamąjo gelio), pirmiausiai užpilkite skiriamąjį gelį palikdami 2cm nuo viršaus. Ant viršaus galite užpilkite 3-5mm sluoksnį izopropanolio, taip gelis greičiau polimerizuos ir jo paviršius bus lygus.
5. Pasibaigus gelio polimerizacijai izopropanolį nupilkite, likučius nusausinkite, perplaukite distiliuotu vandeniu ir vėl nusausinkite. Atlikdami šiuos veiksmus stenkitės nepaliesiti gelio.
6. Paruoškite ir užpilkite koncentruojantį gelį.
7. Tarp stiklinių plokštelių įdėkite šukas ir palaukite, kol gelis pilnai polimerizuos. Lėtai ištraukite šukas. Procedūros metu rekomenduojama dėvėti apsauginius akinius.

- Kai tik polimerizacija pasibaigia, gelis gali būti naudojamas elektroforezei. Tam pirmiausiai išimkite elektroforezės modulį iš stovo (pasukite rankenėles žemyn). Neatsukite elektroforezės modulio varžtų!
- Elektroforezės modulį įdėkite į elektroforezės kamerą.

### Elektroforezės sąlygos

- Įpilkite apie 1 litrą buferio į elektroforezės kamerą ir apie 100ml į ertmę susidarančią tarp stiklinių gelio plokštelių. Paprastai baltymų elektroforezei naudojamas Tris-glicino buferis: 25 mM Tris bazė, 250 mM glicinas (pH 8,3), 0,1 % natrio dodecilsulfato, o DNR elektroforezei  $1 \times$  TBE.
- Darbinės elektroforezės sąlygos yra apibendrintos Lentelėje 1. Tačiau sąlygos gali keistis priklausomai nuo gelio tūrio, sudėties ir poliakrilamido polimerizacijos lygio. Reikalinga srovė turi būti didinama proporcingai gelio tūriui ir storiui (jeigu tai nėra ribojama įtampos). Pavyzdžiui, dviems geliams reikia dvigubai didesnės srovės, nei vienam kai įtampa yra ta pati. Didėjant gelio koncentracijai elektrinė varža taip pat didėja, ko pasekoje migracijos greitis sulėtėja. Tokiu atveju įtampa gali būti didinama, tačiau reikia imtis priemonių, kad gelis neperkaistų. Gelių laidumas nedisosicijuojančiose buferinėse sistemose varijuoja labai stipriai, todėl sąlygos turi būti nustatytos empiriškai.
- Lentelėje 1 nurodytos sąlygos galioja Tris-glicono su natriododecilsulfatu geliams. Jeigu elektroforezės metu įranga per daug įkaista rekomenduojama sumažinti srovę/įtampą.

Lentelė 1

<i>Buferio tūris (ml)</i>	<i>Apytikslis gelio tūris (ml)</i>	<i>Maksimali įtampa (V)</i>	<i>Maksimali srovė (mA)</i>
Viršutinis rezervuaras 100	7	150-225	25-45 (1 gelis)
Apatinis rezervuaras 1000			50-85 (2 geliai)

### Pavyzdžio užnešimas

- Atsargiai išimkite šukas ir iškart praplaukite šulinėlius buferiu naudodami švirksštą arba Pastero pipetę. Jeigu vykdoma elektroforezė denatūruojančiame natrio dodecilsulfato gelyje, prieš pavyzdžio užnešimą srovės per gelį leisti nereikia. Jeigu vykdoma nendenatūruotų baltymų arba DNR elektroforezė, prieš užnešant pavyzdžius srovė leidžiama 30 min. Lentelėje 2 pateikta, kokie kiekiai baltymo gali būti naudojami.

Lentelė 2

<i>Gelio šulinėliai</i>	<i>Viena juosta</i>	<i>Kelios juostos</i>	<i>Pavyzdžio tūris</i>
1 mm × 4 mm	1-6 μg	30-60 μg	<40 μl
1,5 mm × 4 mm	1-10 μg	50-100 μg	<60 μl

- Prieš užnešimą sumaišykite tiriamą baltymų pavyzdį su užnešimo buferiu, kaip nurodyta jūsų darbo protokole. Pakaitinkite pavyzdį 3 min prie 100 °C arba 50 min prie 80 °C ir nucentrifuguokite 5 min prie 12000 g.
- Užneškite pavyzdžius nanudodami pipetę su specialiu antgaliu. Stenkites, kad užnešant nepatektų nuosėdos nuo mėgintuvėlio dugno. Pipetės antgalio galiukas turi būti laikomas 1-2 mm atstumu nuo šulinėlio dugno, tokiu būdu pavyzdys mažiau atsiskiedžia ir užnešamos kondensuotesnės pavyzdžio juostos. Tam, kad būtų palaikoma vienoda įtampa visame gelio

plote, pripildykite nenaudojamos šulinėlius tokiu pačiu tūriu 1 × buferio. Sandariai uždarykite elektroforezės kameros dangtį ir įsitikinkite, kad jungiamieji laidai gerai pritvirtinti.

4. Sujunkite elektroforezės kamerą su maitinimo bloku. Įjunkite srovės šaltinį. Nustatykite reikiamą srovę/įtampą (žr. Lentelę 1).

### **Elektroforezės užbaigimas**

1. Išjunkite srovę, tada išjunkite maitinimo bloką ir **tik tada atjunkite laidus, jungiančius elektroforezės kamerą su maitinimo bloku.**
2. Nuimkite elektroforezės kameros dangtį.
3. Išimkite elektroforezės modulį iš kameros ir išpilkite buferį iš viršutinio rezervuaro. Dabar galite lėtai atsukti varžtus ir išimti gelius.
4. Pradėdami nuo gelio apačios, atskirkite stiklines plokšteles naudodami plačią buką plokštelę.
5. Atsargiai perkelkite gelį į dažymo indą arba ant membranos.
6. Išėmus gelį, išplaukite stiklines plokšteles, perskalaukite distiliuotu vandeniu. Kriauklės dugne galima patiesti porolono, tai sumažins sudužimo riziką.
7. Išpilkite buferį iš elektroforezės kameros ir ją išplaukite.
8. Išplaukite elektroforezės modulį ir nusauskite elektrodų jungtis. Nenaudokite organinių tirpiklių.

### **Problemos ir jų sprendimas**

1. Užpylimo metu gelis pradeda sunktis.
  - Patikrinkite, ar stiklinės plokštelės ir tarpinės yra švarios.
  - Patikrinkite, ar po to, kai elektroforezės modulis buvo įdėtas į laikiklį gelio užpylimui plokštelių apačia išliko viename lygyje su elektroforezės modulio apačia.
  - Patikrinkite, ar visi varžtai yra užveržti.
  - Užtepkite vazelino ant tarpinių prieš surinkdami stiklines gelio plokšteles.
  - Gelio apačia gali būti užsandarinama agaroze. Tam paruoškite 1 % agarozės tirpalą 375 mM Tris'e, pH 8,8 (baltymų geliams), arba 1 × TBE (DNR geliams) ir tirinkite ją, kol nebesimatys dryžių. Palenkite gelio užpylimo stovą taip, kad agarozė pasiskirstytų abipus stiklinių gelio plokštelių apatinės dalies. Agarozės sluoksnis turi būti ~5 mm aukščio. Po kelių minučių, kai agarozė sustingsta, galima užpilti poliakrilamido gelį. Elektroforezės metu agarozės pašalinti nereikia.
  - Prieš pritvirtinant tvirtinančiąsias plokšteles, apatinė stiklinių plokštelių dalis gali būti apklijuojama izoliacine juosta. Prieš pradėdant elektroforezę juosta turi būti nuimta.
2. Užpilant gelį susidaro oro burbulai.
  - Arba iškart pašalinkite burbulus naudodami ploną tarpinę, arba šiek tiek palenkę pastuksenkite per elektroforezės modulį.
3. Gelis nepilnai polimerizuojasi.
  - Taip gali atsitikti jeigu temperatūra yra per žema, per mažai TEMED, senas (suskilęs) TEMED, senas amonio persulfatas, per maža akrilamido koncentracija. Todėl visada naudokite šviežiai paruoštus tirpalus, ypač amonio persulfatą. Prieš naudojimą tirpalus nuorinkite.
4. Elektroforezė nevyksta / nėra oro burbuliukų ties elektrodais.
  - Patikrinkite visas jungtis ir jungiklius. Įsitikinkite, kad buferio lygis viršutiniame rezervuare susisieks su gelio viršum.
5. Stiklinės plokštelės suskyla elektroforezės metu.
  - Taip gali atsitikti, jeigu varžtai buvo per daug užveržti. Todėl niekada neužveržkite per daug. Pasistenkite, kad užveržiant spaudimas plokštelėms

didėja lėtai ir tolygiai. Sumažinkite įtampą elektroforezės metu, tada gelis per daug neįkais.

6. Pakilę gelio kraštai, “šypsosi”.

- Buvo nevienodas temperatūros pasiskirstymas visame gelio plote. Sumažinkite įtampą ir padidinkite šaldymą elektroforezės metu. Prieš elektroforezę būtinai užpildykite tuščius šulinėlius buferiu.

7. Juostose matomi vertikalūs dryžiai.

- Gali būti, kad gelio mišinyje buvo purvo galelių. Ruošdami tirpalus naudokite švarius indus. Jei reikia, tirpalus prieš naudojimą nufiltruokite ir nuorinkite.
- Tiriama pavyzdžiai nebuvo nucentrifuguoti prieš užnešimą ant gelio, todėl kartu su pavyzdžiu buvo užneštos ir nuosėdos.
- Buvo užnešta per daug baltymo. Atskieskite tiriamąjį pavyzdį.
- Elektroforezės metu sumažinkite įtampą.

8. Juostos yra dėmės formos.

- Taip gali atsitikti dėl difuzijos prieš pradėdant elektroforezę. Pasistenkite pavyzdžius užnešti greičiau ir iškart pradėkite elektroforezę.

9. Juostos yra išplitę.

- Užnešta per daug baltymo į per mažus šulinėlius, arba gelis yra per plonas. Užneškite mažiau baltymo.
- Per didelė įtampa sumažina elektroforezės trukmę, tačiau tai pablogina baltymų atskyrimo efektyvumą. Sumažinkite įtampą elektroforezės metu.
- Su DNR geliais: naudokite tą patį  $5 \times$  TBE tirpalą ruošdami gelį ir elektroforezės buferį. Nedideli koncentracijų skirtumai gali labai stipriai pabloginti atskyrimą.