



Katedra za biologiju

Vizuelizacija *end-point* PCR produkata

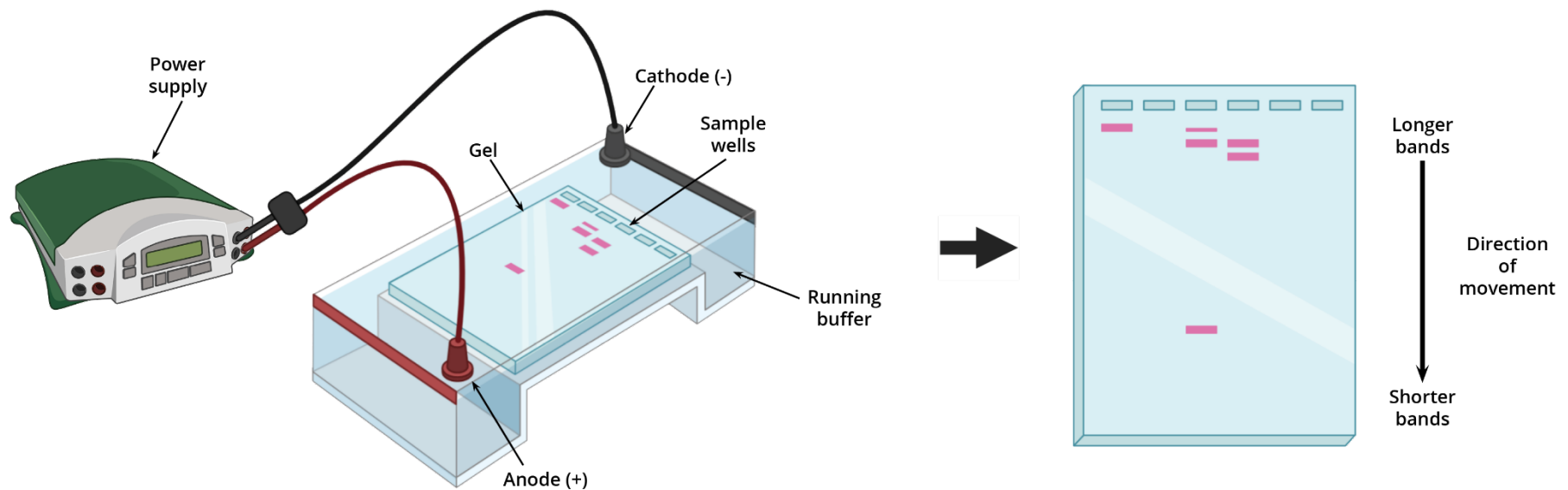
- ELEKTROFOREZA
- SEKVENCIRANJE

Po završetku PCR amplifikacije, dobijaju se PCR produkti (amplikoni) čije se očitavanje može obaviti na dva načina:

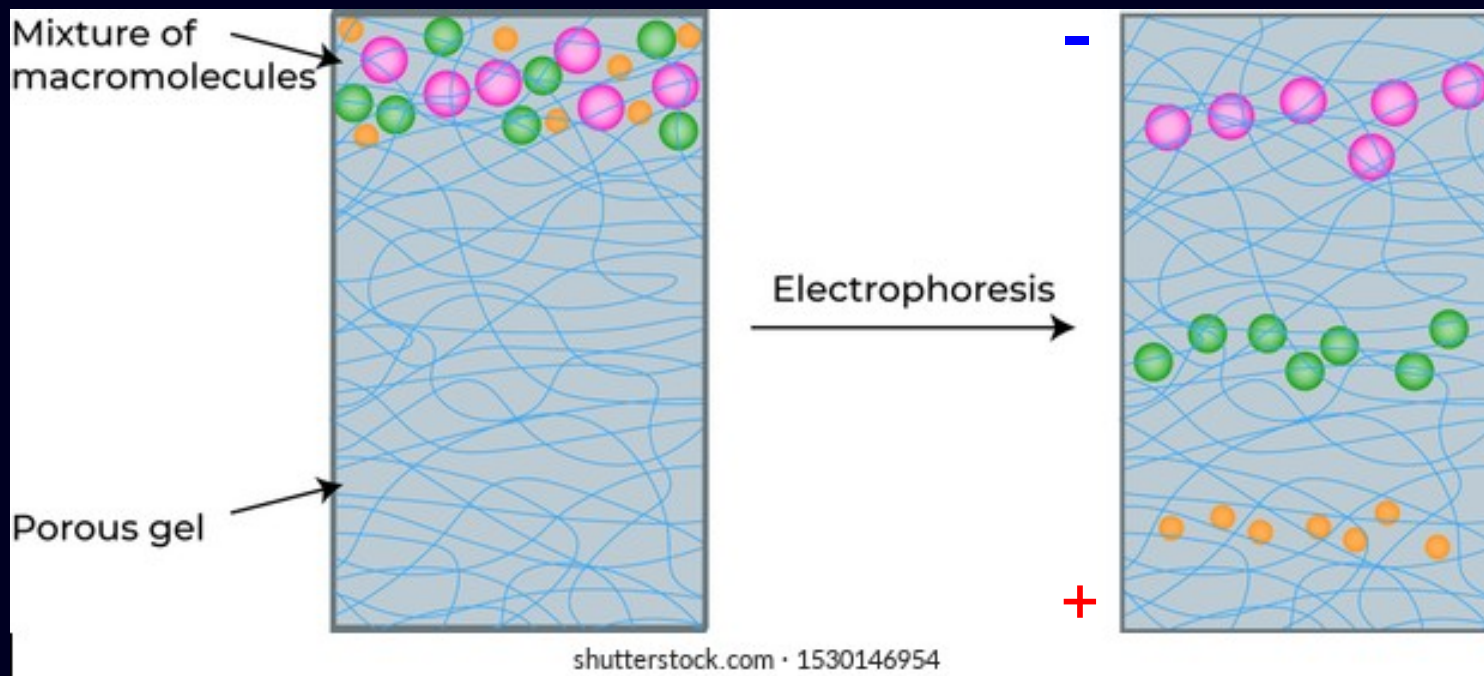
- ELEKTROFOREZOM NA GELU
- SEKVENCIRANJEM

ELEKTROFOREZA

Elektroforeza obezbeđuje razdvajanje molekula različite dužine **pod uticajem električnog polja** prilikom njihovog kretanja kroz **inertan i porozan matriks (agarozni ili poliakrilamidni gel)** potopljen u **rastvor slabog elektrolita**.



Fragmenti DNK različite dužine imaju različitu elektropokretljivost (jer je ukupna količina naelektrisanja DNK proporcionalna njegovoj veličini), te kroz gel putuju različitom brzinom (**od – ka + polu**, obzirom da je DNK molekul negativno naelektrisan).



Zbog toga fragmenti različite dužine tokom trajanja elektroforeze prolaze različiti put:

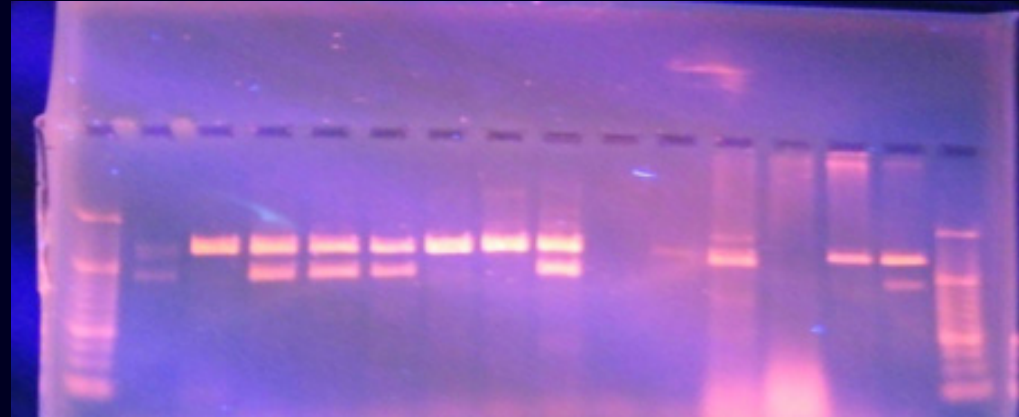
kraći fragmenti (koji se kroz gel probijaju lakše te se kreću brže) **pređu duži put** u odnosu na **duže fragmente** (koji se teže probijaju kroz gel pa se kreću sporije).

Kada se elektroforeza završi, fragmenti različitih dužina su razdvojeni ali još uvek nisu vidljivi, te je neophodno gel obojiti inkubiranjem u rastvoru etidijum bromida - EtBr (ili neke savremene bezbednije alternativne „boje“, npr. *SYBR[®] Safe DNA Gel Stain*, *GelRed[®]* and *GelGreen[®]* i dr.) koji interkalira između parova baza dva lanca DNK.

EtBr (ili alternativna „boja“) fluorescira pod UV svetlošću, te je za konačnu **vizuelizaciju rezultata** neophodno da se gel (nakon bojenja sa EtBr) postavi na UV transiluminator.



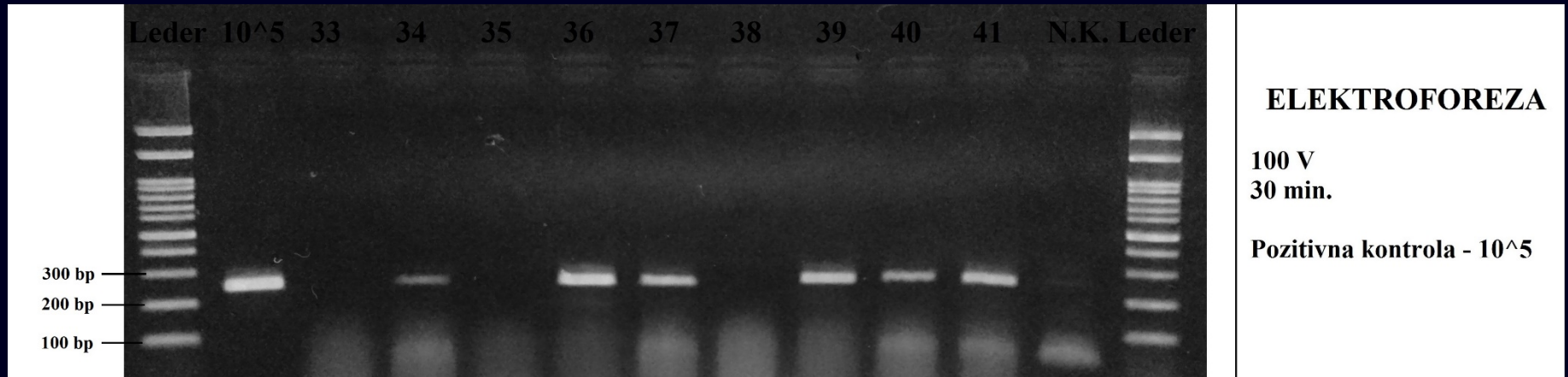
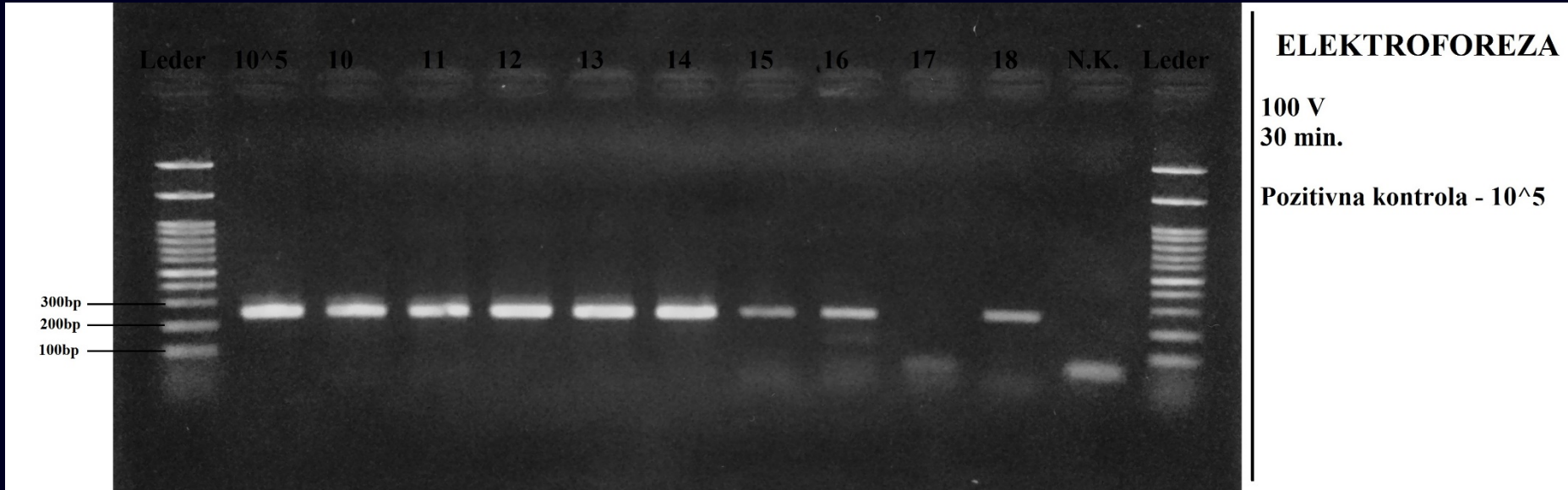
Aparat za horizontalnu elektroforezu



Rezultat elektroforeze na agaroznom gelu

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

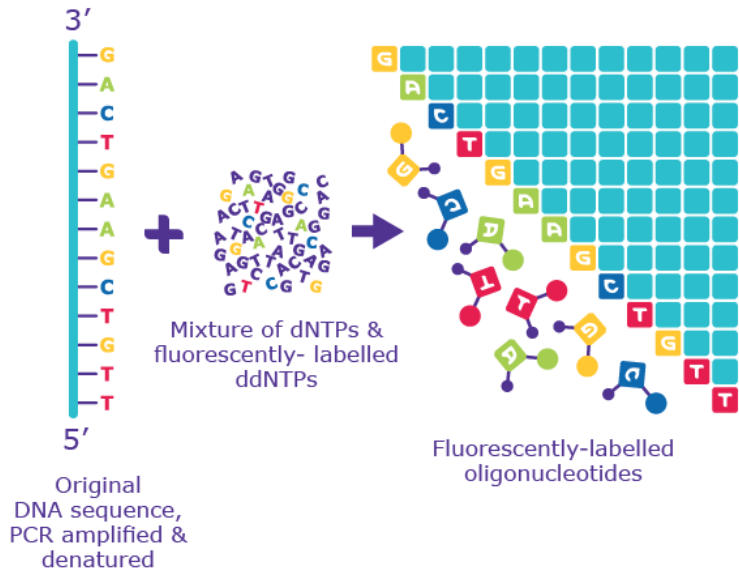
Rezultat elektroforeze na agaroznom gelu



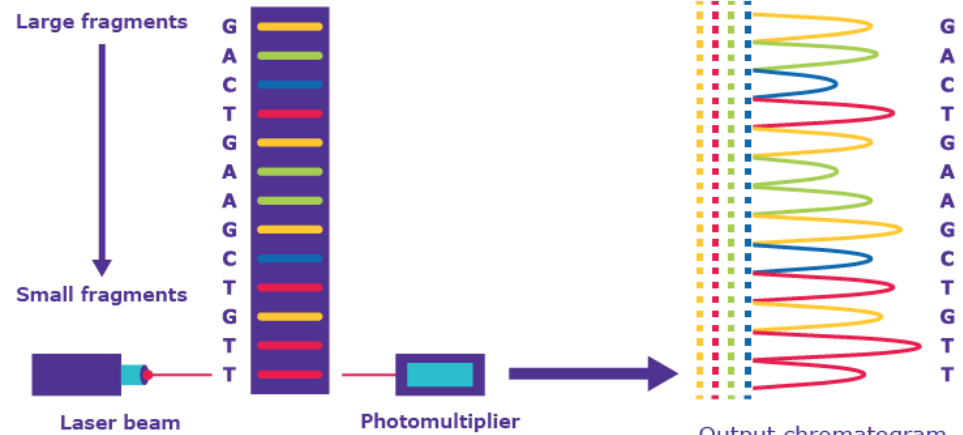
SEKVENCIONIRANJE

Sanger metoda sekvenciranja DNK

1 PCR with fluorescent, chain-terminating ddNTPs



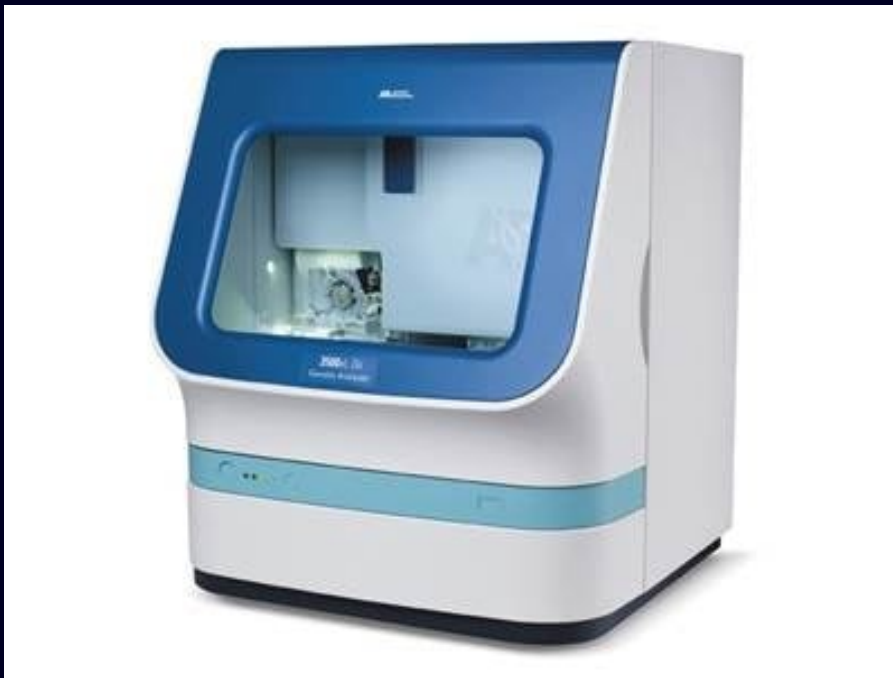
2 Size separation by capillary gel electrophoresis



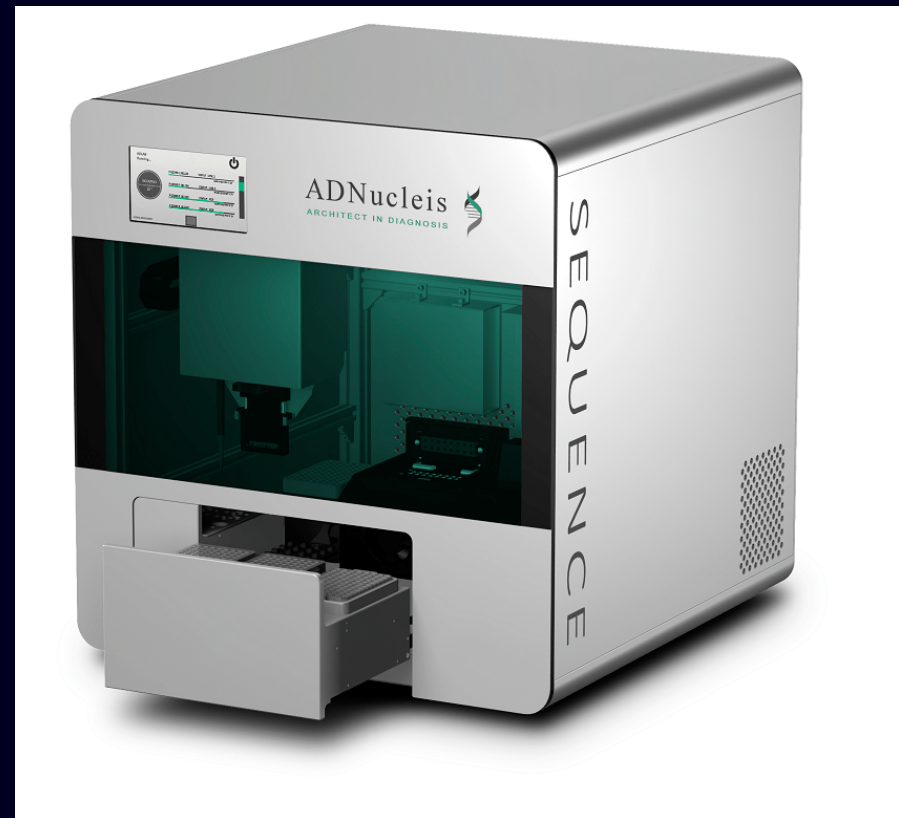
3 Laser excitation & detection by sequencing machine



Aparat za sekvenciranje – sekvencer
(starije proizvodnje)



Aparati za sekvenciranje –
sekvenceri (savremeniji)



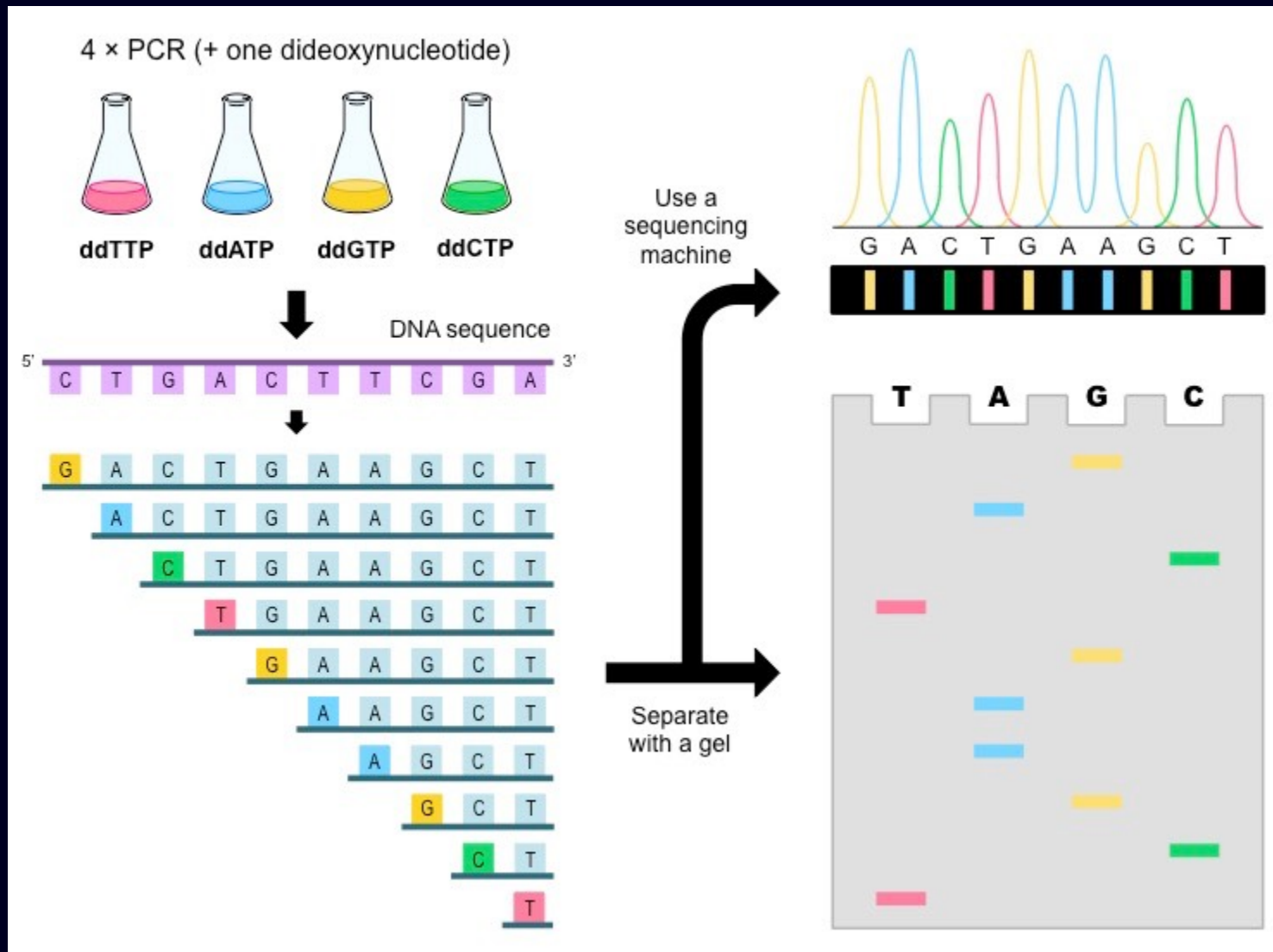


Mini sekvencer (novije generacije)



Aparat za „*next-generation sequencing (NGS)*“

Sanger metoda sekvenciranja DNK



Rezultat sekvenciranja

File: 060425-03_K06_B3-E2.ab1 Run Ended: 2006/4/26 9:35:34 Signal G:81 A:448 C:93 T:524
Sample: B3_E2 Lane: 21 Base spacing: 14.219999 837 bases in 10331 scans Page 1 of 2

