***2.4 Gel elektroforese op het planten DNA en de PCR producten***

*Materialen*:

* Agarose poeder
* Magnetron
* Pipetten
* Elektroforese systeem (incl. tray en kammetje)
* Voeding Centrifuge
* DNA ladder
* Gel Doc systeem (Bio-Rad)

*Oplossingen*:

* 50 x TAE elektroforese buffer:
  + 242 g Tris-HCl
  + 52 ml acetic acid (glacial)
  + Oplossen in 800 ml MilliQ
  + Voeg 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 toe
  + Vul het volume aan tot 1000 ml

* Loading buffer (10 x BXO)
  + 200 M EDTA
  + 0.25 % bromophenolblue
  + 0.25 % xylene cyanol
  + 0.5 % orange G
  + 50% glycerol

* Sybr Safe
  + Gebruik 1 µL / 25 mL agarose gel: **toxisch, werk met handschoenen!**
* DNA monster
* DNA ladder (1Kb ladder).

***Procedure voor het bereiden van een gel***

Maak 500 ml 1x TAE elektroforese buffer door 50x TAE elektroforese buffer te verdunnen met demi-water (schrijf je berekening op in je labjournaal).

**Met handschoenen aan:** verwijder de kam voorzichtig uit de tray zonder de welletjes of de gel te beschadigen.

**Met handschoenen aan:** Plaats de tray in het elektroforese system en vul het bakje met 1x TAE. Het buffer oppervlakte moet ongeveer 1 mm boven het oppervlakte van de gel staan (= submarine).

***Procedure voor het laden van een gel***

Maak je DNA monsters klaar door er de ***juiste hoeveelheid loading buffer*** aan toe te voegen, zodat de eindconcentratie van de loading buffer 1x is.

Meng het DNA monster en de loading buffer door tegen de zijkant van het epje te tikken. Indien nodig kun je de epjes daarna kort centrifugeren voor 5 seconden.

Neem het totale monster voor de gel op zonder hierbij luchtbellen op te nemen en pipetteer het monster in een gel welletje: Plaats je beide ellebogen op de tafel, houdt de pipet **verticaal** en met beide handen vast. Wanneer je het monster in de gel pipetteert ga dan slechts tot de eerste weerstand.

Pipetteer 5 µL DNA ladder in het eerste en het laatste welletje van de gel.

**Schrijf in je labjournaal op welk DNA monster in welk welletje is gepipetteerd.**

Zet het deksel op de elektroforese bak en sluit deze aan op de voeding. **Let hierbij op de + en – kant.** DNA is negatief geladen en zal dus naar de positieve pool migreren.

Zet de stroom aan op een geschikte hoogte (~5 V per cm agarose gel). Aan de loading buffer kun je zien hoe ver de DNA fragmenten gelopen zijn. Wanneer je klaar bent zet je de stroom uit en verwijder je de kabels uit de apparatuur.

**Met handschoenen aan:** Neem de tray met daarin de gel uit het elektroforese systeem.

Neem de gel mee naar het Bio-Rad Gel Doc systeem.

Plaats de gel op de Trans-illuminator en zet het systeem aan. In het programma selecteer je ‘nucleic acid, SyberSafe’. Gebruik de ‘position gel’ button om de gel recht en in het midden onder de camera te plaatsen. Wanneer je gel goed ligt, gebruik je de ‘run protocol’ button om de foto te maken. Het contrast kan worden aangepast via het incoontje dat een zonnetje weergeeft.

Sla de foto op (file 🡪export 🡪 export for publication 🡪 kies de juist naam en het juiste format. Sla op op een USB stick, je hebt de foto nodig voor je labjournaal en je verslag.

De gel wordt weggegooid in het speciale SybrSafe afval.

Maak de Trans-illuminator schoon.

Analyseer de laantjes en banden. Vergelijk de hoogte van de banden met de marker:

* Hoe groot is het chromosomale DNA? Is het DNA intact?
* Hoe groot zijn de PCR fragmenten?
* Hebben ze dezelfde grootte voor alle planten?
* Zijn alle banden even dik/intens? (de intensiteit is een maat voor de hoeveelheid DNA)