

Dělicí techniky nukleových kyselin

- **Metody**
 - Centrifugační
 - Elektromigrační
 - Chromatografické
- **Vlastnosti využívané pro dělení biomakromolekul**
 - Molekulová hmotnost
 - Konformace a tvar
 - Náboj
 - Hustota

Metody elektroforetické

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů

- **Princip**

- Pohyb nabitých molekul nukleových kyselin v elektrickém poli
- Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny

- **Cíl**

- Dělení molekul na základě rozdílných elektroforetických pohyblivostí

Gelová elektroforéza

- **Základ**

- Z praktických důvodů se elektroforéza neprovádí přímo v roztoku, ale na **vhodném nosiči**
- V případě nukleových kyselin bývá nosičem nejčastěji **gel**
- Pro přípravu gelu jsou výhodné látky, které samy gelují a mají různou porozitu v závislosti na koncentraci gelu

- **Výhody**

- Elektroforetické metody nahradily ultracentrifugaci
- Aparatury jsou levné, často je lze vyrábět svépomocí
- Dělit lze všechny důležité biomakromolekuly
- Změnou podmínek lze dělit podle různých hledisek
- Rychlost
- Lze pracovat s mikrokvanty nebo preparativně v mikrogramových množstvích
- Rozdělené molekuly lze snadno prokázat a ve funkční formě izolovat z gelu

Používané nosiče

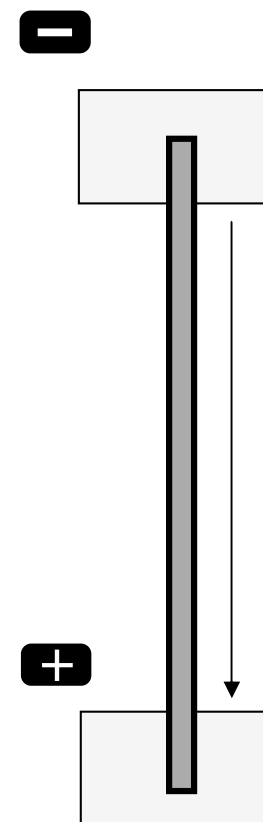
- Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny
 - agarózou
 - polyakrylamidem
- Vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry
- Velikost pórů lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru
- Optimální velikost separovaných molekul
 - agarózové gely 100 bp až 50 000 bp
 - polyakrylamidové 10 až 1000 bp

Uspořádání gelové elektroforézy

- Horizontální



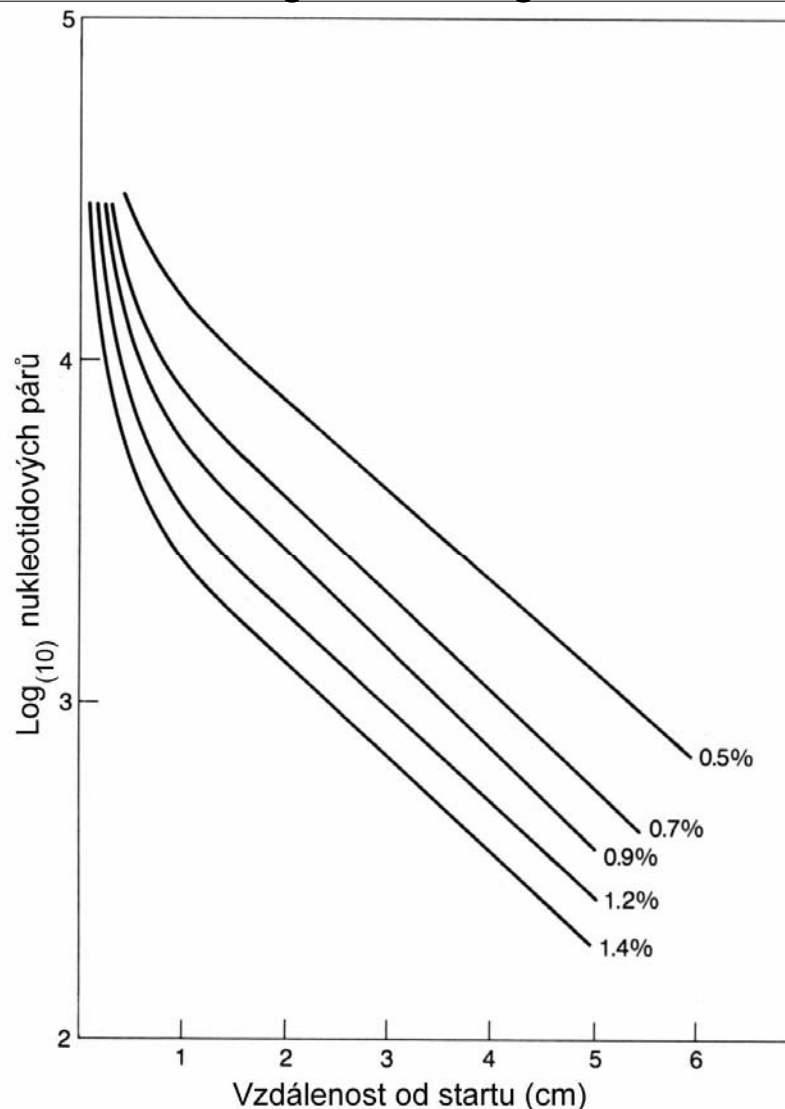
- Vertikální



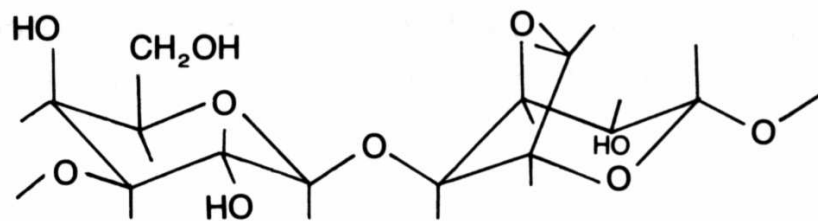
Elektroforetická pohyblivost DNA

- Rychlost pohybu molekul DNA v gelu označovaná jako **elektroforetická pohyblivost je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti.**
- Velikost fragmentu DNA o neznámé velikosti lze proto stanovit srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí fragmentů o známé velikosti, označovaných jako **standardy velikosti** nebo **hmotnostní standardy.**
- Těmi bývají většinou restriční fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž přesná velikost byla stanovena sekvencováním.

Vztah mezi velikostí DNA a její elektroforetickou pohyblivostí v agarózovém gelu



Agarózové gely

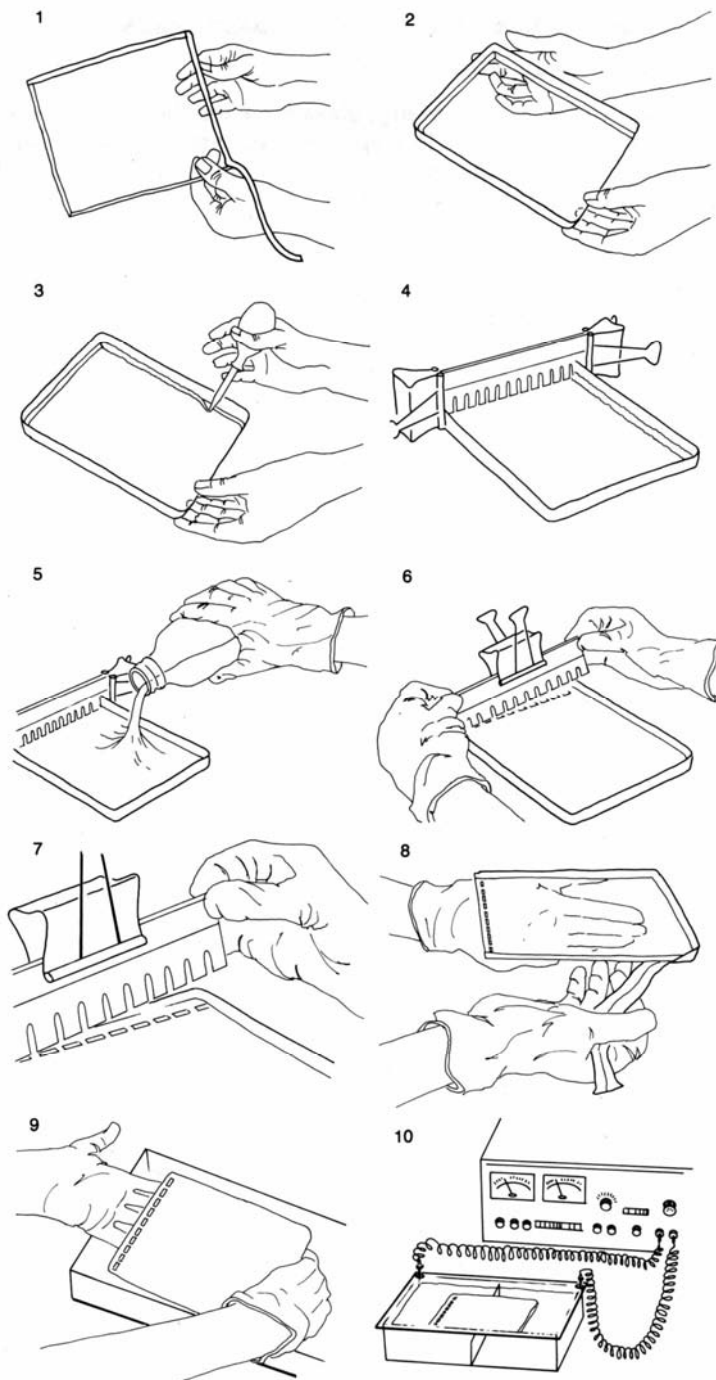
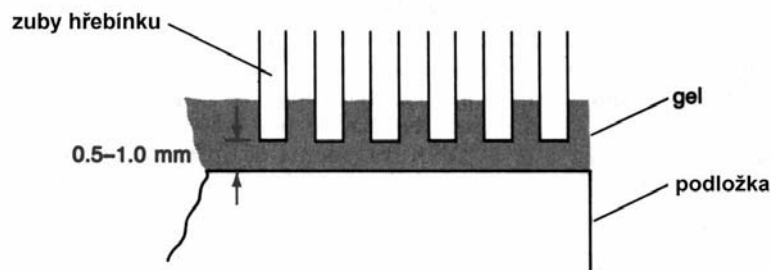


D-galaktóza

3,6-anhydro-L-galaktóza

Separáční schopnosti gelu v závislosti na koncentraci agarózy

| Koncentrace agarózy | Rozsah dělení ds DNA |
|---------------------|----------------------|
| 0,3 % | 5 – 60 kb |
| 0,6 % | 1 – 20 kb |
| 0,7 % | 0,8 – 10 kb |
| 0,9 % | 0,5 – 7 kb |
| 1,2 % | 0,4 – 4 kb |
| 1,5 % | 0,2 – 3 kb |
| 2,0 % | 0,1 – 2 kb |



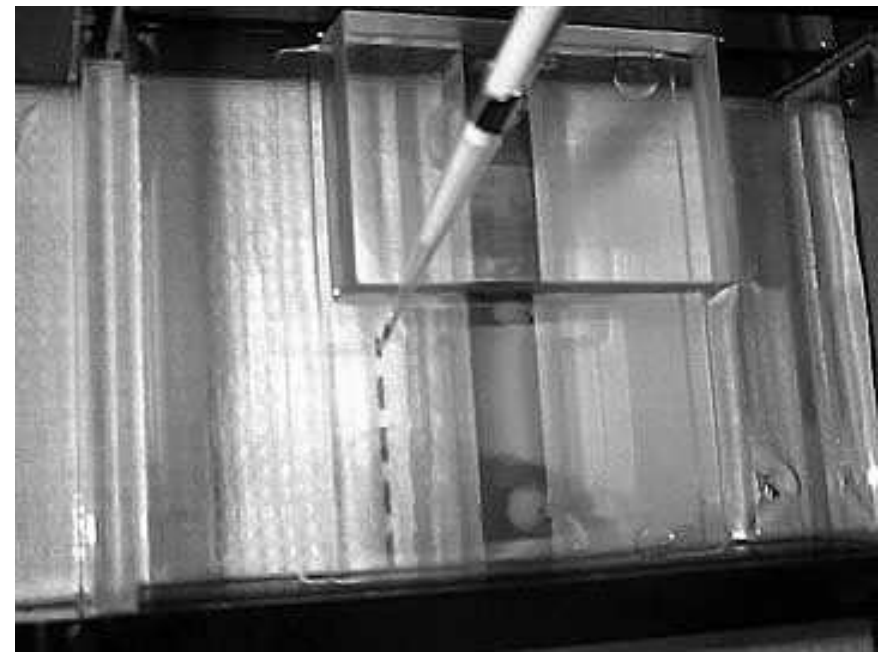
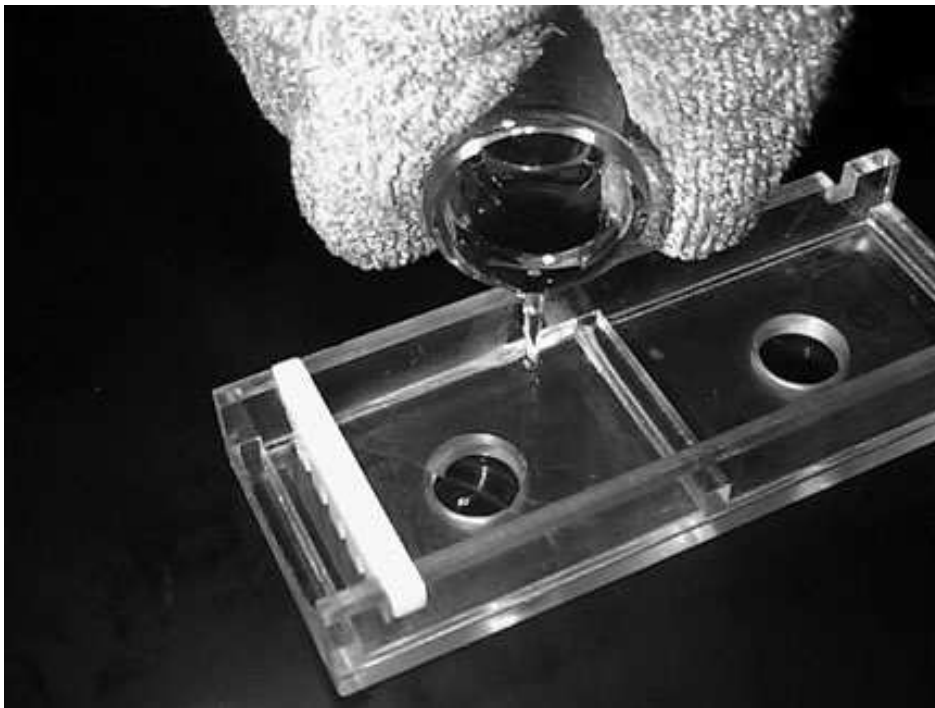
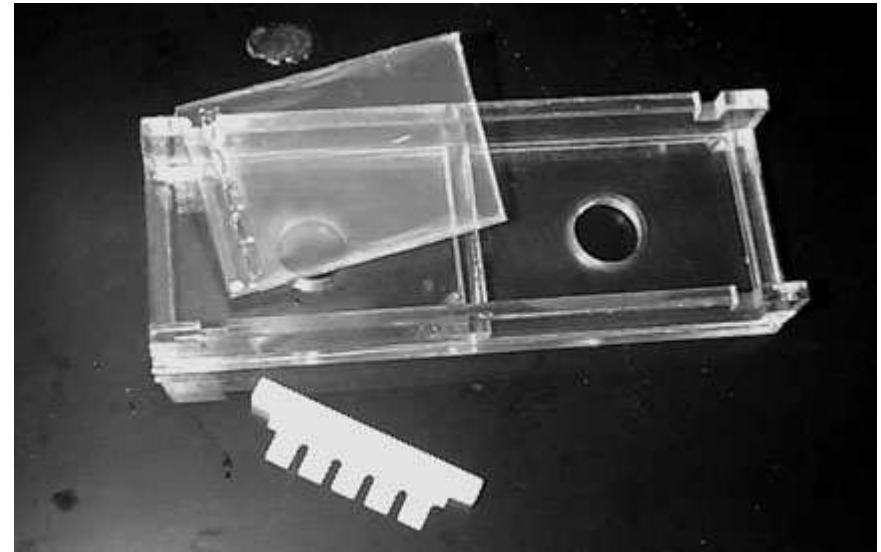
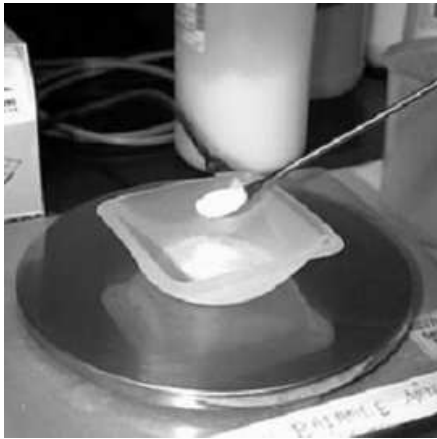
Speciální typy agaróz

- Některé komerčně dostupné agarózy nejsou zcela čisté; jsou kontaminovány dalšími polysacharidy, solemi a proteiny.
- Tyto látky mohou ovlivnit jak rychlost migrace DNA v gelu, tak použitelnost DNA vyizolované z gelu.
- Řada výrobců připravuje speciální typy agaróz pro daný účel
 - Agarózy s nízkým bodem tání/tuhnutí (LMT) pro preparativní účely
 - Agarózy s vysokou rozlišovací schopností pro analýzu velmi malých fragmentů (10 – 500 bp). Používané koncentrace jsou 4-10 %.


Alkalická agarózová elektroforéza

- Pro analýzu ssDNA nebo RNA
 - Analýza velikostí cDNA
 - Analýza S1 nukleáza rezistentních DNA:RNA hybridů
 - Srovnání velikostí prvního a druhého řetězce cDNA syntetizovaného zpětnou transkriptázou
 - Kontrola aktivity enzymů vytvářejících jednořetězcové zlomy
- Alkalické pufrы obsahují 50 mM NaOH.
Za přítomnosti NaOH se agaróza nerozvaří, proto musí být NaOH přidáván až po rozvaření.
- Detekce pomocí ^{32}P značených konců

Příprava agarózového gelu



Příprava polyakrylamidových gelů

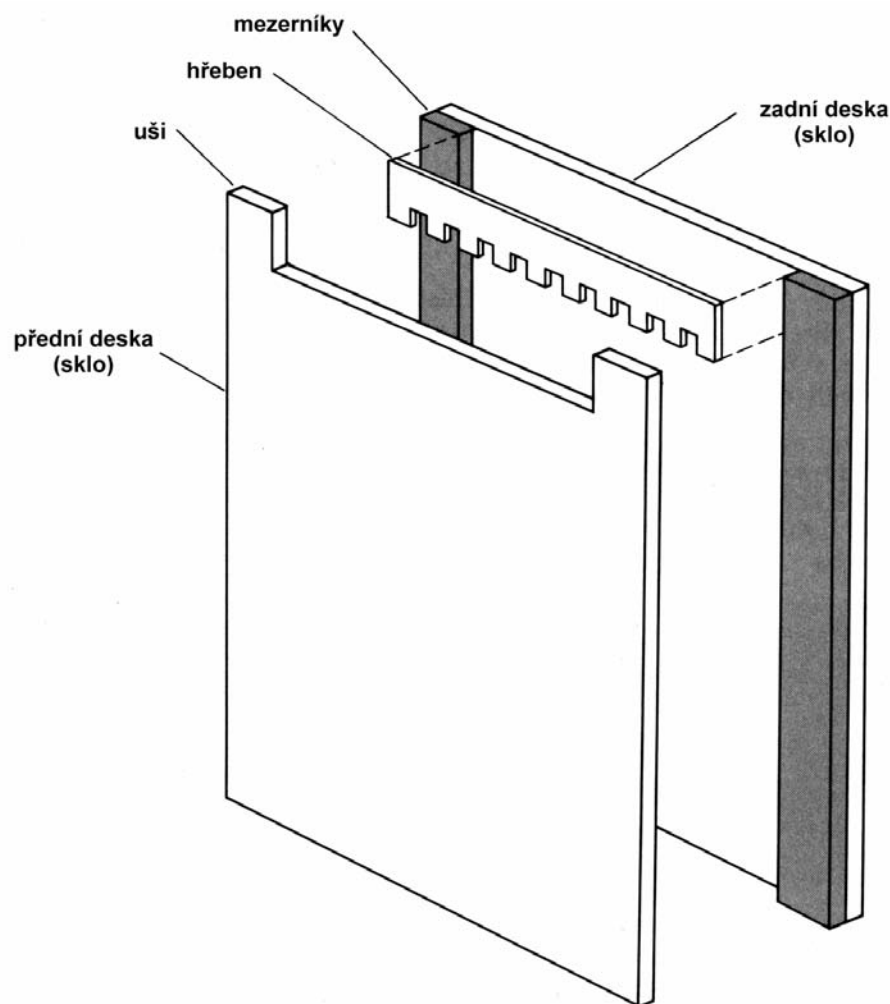
- Složení: kopolymer akrylamidu a N,N,- metylenbisakrylamidu
- Monomer je neurotoxin  a mutagen
- Katalyzátor – tetramethylethyldiamin (TEMED)
- Iniciátor – persíran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- Radikálová polymerace
- V důsledku přítomnosti bifunkčního agens N,N,- metylenbisakrylamidu řetězce kroslinkují a vytvářejí gel

Separční schopnosti elektroforetických gelů v závislosti na koncentraci akrylamidu

| Koncentrace polyakrylamidu v gelu | Rozsah dělení dsDNA |
|-----------------------------------|---------------------|
| 3,5 % | 1000 – 2000 bp |
| 5,0 % | 80 – 500 bp |
| 8,0 % | 60 – 400 bp |
| 12,0 % | 40 – 200 bp |
| 15 % | 25 – 150 bp |
| 20 % | 6 – 100 bp |

Aparatura pro vertikální elektroforézu

Polyakrylamidové gely se připravují obtížněji než agarózové.
Obvykle se lijí mezi dvě skla oddělená mezeríky.



Typy polyakrylamidových gelů

- **Nedenaturující gely**

- Gely pro separaci dvouřetězcových molekul v nativním stavu
- Jsou používány pro separaci malých fragmentů dsDNA a heteroduplexů

- **Denaturující gely**

- Gely separující jednořetězce
- Jsou používány při sekvencování

- **Denaturující gradientové gely**

- Fragmenty DNA se pohybují gelem, v němž se zvyšuje koncentrace denaturačního agens
 - Močovina
 - Formamid
- Používají se pro separaci stejně dlouhých fragmentů lišících se svou sekvencí

Gely pro sekvencování

- Výsledkem reakcí používaných při sekvencování DNA jsou jednořetězcové oligonukleotidy o délce desítek až stovek bází.
- Lze je účinně oddělit na **denaturujících polyakrylamidových gelech**.
- Podmínky elektroforézy musí být takové, aby se během separace zabránilo vytváření lokálních dvouřetězcových struktur.
- Používají se gely s vysokou koncentrací denaturujících látek (např. močoviny).
- Vlastní elektroforéza probíhá při vysokém napětí.
- To má za následek, že se gel zahřeje na 50-70 °C.
- Kombinace těchto dvou faktorů zaručuje úplnou denaturaci jednořetězců.

Pufry pro nanášení vzorků

- Nanášecí pufry slouží při elektroforéze NA
 - Zvýšení hustoty vzorku - to umožní, že DNA klesne na dno jamky
 - Obarvení vzorku pro snadnější nanášení
 - Přidání pohyblivého barviva do vzorku pro možnost sledování průběhu elektroforézy
- Rozdělení nanášecích pufřů
 - Založené na sacharóze
 - Založené na glycerolu
 - Založené na Ficollu[®]
 - Kombinované
 - Alkalické

Přehled pohyblivých barviv v nanášecích pufrech

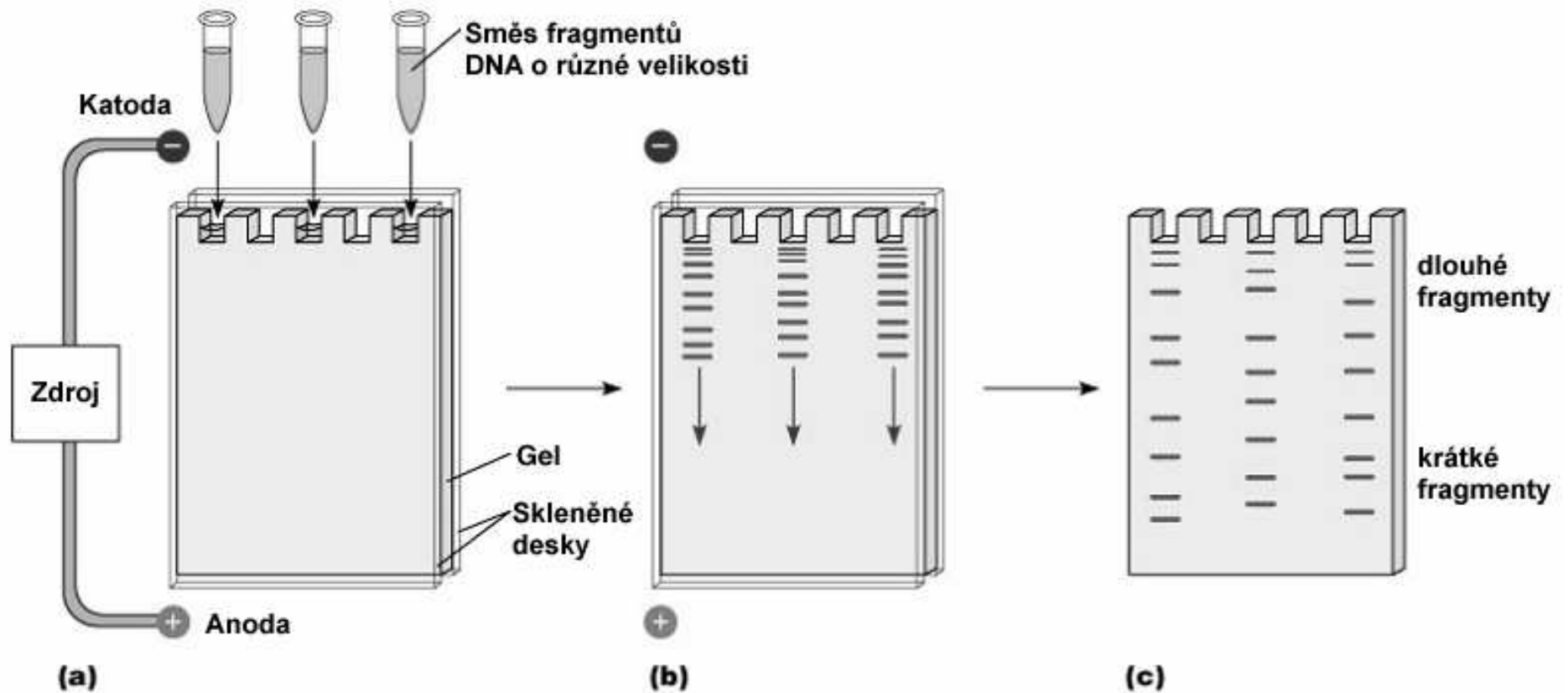
Migrace barviv je více ovlivněna nábojem než velikostí molekuly

| | 0,5 – 1,4 % agaróza | 4 % polyakrylamid | 6 % polyakrylamid |
|---------------------|---|----------------------|----------------------|
| Xylencyanol | 4 kb | 170 bp | 105 bp |
| Bromfenolová modř | 300 bp | 40 bp | 25 bp |
| Oranž G | 50 bp | - | - |
| Bromkresolová zeleň | Pouze pro alkalickou agarózovou elektroforézu 100 bp | | |

Používané elektroforetické pufry

| Pufr | Zkratka | Pracovní koncentrace | Zásobní koncentrace |
|----------------|------------|--|---------------------|
| Tris-acetátový | TAE | 1×: 0,04 M Tris-acetát 1 mM EDTA | 50× |
| Tris-fosfátový | TPE | 1×: 0,09 M Tris-fosfát 2 mM EDTA | 10× |
| Tris-borátový | TBE | 0,5×: 45 mM Tris-borát 1 mM EDTA | 5× |
| Alkalický | | 1×: 50 mM NaOH 1 mM EDTA | 1× |
| Tris-glycinový | | 1×: 25 mM Tris 250 mM glycin 0,1 % SDS | 5× |

Provedení elektroforézy



Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

1. Molekulová velikost DNA

- Molekuly lineární dsDNA se pohybují rychlostí, která je nepřímo úměrná logaritmu (\log_{10}) jejich velikosti - počtu párů bází) $v = \frac{1}{\log M}$
- Molekuly se pohybují ve tvaru závitů přímočaře a plynule od katody k anodě
- Efekt molekulárního síta – větší molekuly migrují mnohem pomaleji vzhledem k většímu třecímu zbržd'ování

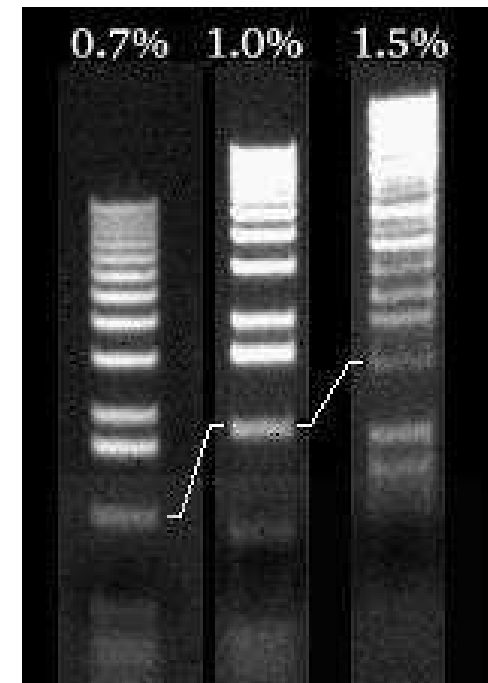
Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

2. Koncentrace gelu

- Lineární DNA fragmenty dané velikosti migrují různou rychlostí gely obsahujícími různou koncentrací gelu. Platí lineární vztah mezi logaritmem elektroforetické mobility DNA (m) a koncentrací gelu (t):

$$\log m = \log m_0 - K_r t,$$

kde m_0 je volná elektroforetická mobilita DNA a K_r je retardační koeficient, konstanta, která souvisí s vlastnostmi gelu a velikostí a tvarem migrujících molekul.
Viz též tab. koncentrací.



Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

3. Konformace DNA

- Superhelikální forma (forma I), otevřená kruhová forma (forma II) a lineární forma (forma III) DNA téže velikosti migrují agarozovým gelem různou rychlostí.
- Relativní mobilita těchto tří forem závisí především na koncentraci agarozy v gelu, ale je ovlivněna rovněž silou aplikovaného proudu, iontovou silou pufru a hustotou superhelikálních otáček u formy I.
- Za určitých podmínek migruje forma I rychleji než forma III; za jiných podmínek je tomu naopak. Forma II je vždy nejpomalejší.
- Jednoznačnou metodou pro identifikaci různých konformačních forem je provedení elektroforézy za přítomnosti zvyšující se koncentrace EtBr.
 - Odstraňují se negativní superhelikální otáčky v DNA, zvětšuje se průměr molekuly a rychlost pohybu se snižuje
 - Při kritické koncentraci barviva (0,1 – 0,5 mg ml⁻¹) již žádné superhelikální otáčky nejsou a DNA dosahuje nejnižší migrační rychlosti

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

4. Aplikovaná voltáž (V/cm)

- Při nízké voltáži je rychlost migrace lineární DNA proporcionální aplikované voltáži.**
- Se zvyšující se silou elektrického pole se rychlost migrace fragmentů zvyšuje rozdílně a efektivní rozsah separace v agarozovém gelu je snížen.**
- Pro maximálního rozlišení DNA fragmentů větších než 2 kb je horní hranice 5 V/cm.**

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

5. Směr elektrického pole

- DNA molekuly větší než 50 kb migrují v agarozovém gelu stejnou rychlostí ve směru konstantního elektrického pole.**
- Jejich rychlosti se změní v pulzním poli při pulzní gelové elektroforéze.**

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

6. Složení bází a teplota

- V agarozovém gelu na rozdíl od PAGE složení bází ani teplota (v rozmezí 4 – 30 °C) neovlivňují rychlost migrace.
- Elektroforéza se obvykle provádí při pokojové teplotě
- Gely z LMT nebo o nízké koncentraci (0,3 %) se pouští při 4 °C.

7. Přítomnost interkalačních barviv

- EtBr snižuje elektroforetickou mobilitu lineárních molekul asi o 15%.
- Interkalací EtBr se prodlužuje délka molekul DNA (lineárních a OC).

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

8. Složení elektroforetických pufců

- Mobilita je ovlivněna iontovou silou a složením elektroforetického pufcu.**
- Za nepřítomnosti iontů je rychlost migrace nízká nebo žádná.**
- 3 základní pufry: TAE, TBE a TPE (pH okolo 7,5-7,8).**

Metody detekce

- Po proběhnutí elektroforézy je třeba identifikovat polohy rozdělených molekul, které nejsou pouhým okem viditelné.
- Molekuly DNA lze snadno zviditelnit
 - Přímým barvením vhodným barvivem
 - Nejjednodušší a nejlevnější
 - Barvivo se váže na DNA
 - Zbarvení je proporcionální koncentraci DNA a tím i velikosti fragmentů
 - Příklad: Spolehlivě detekovatelné množství DNA v proužku na gelu je 1-2 ng. Aby byl detekován fragment o velikosti 200 bp pocházející ze sekvence dlouhé 20 kb, musí být do jamky na gel nanášeno 200 ng DNA.
 - Koncovým značením ^{32}P označených dNTP připojených na konce fragmentů DNA
 - Lze aplikovat jen na vysoce přečištěné sekvence
 - Každý fragment má stejný počet konců, intenzita značky není závislá na délce fragmentu
 - Polohy proužků na gelu se znázorní autoradiograficky
 - Je citlivější než barvicí metody, ovšem dražší
 - Hybridizací se značenou sondou

Rozdělení barviv pro detekci nukleových kyselin

• Klasická barviva NA

- Interkalační fenantridinová barviva
 - Etidium bromid
 - Etidium homodimer
 - Propidium jodid
- Indolová a imidazolová barviva vázající se na menší žlábek
 - DAPI
 - Hoechst (bis-benzimid)
- Další barviva
 - Akridin oranž
 - 7-amino-aktinomycin D
 - Hydroxystilbamidin
 - LDS 751
- Nevyžadující detekci UV-světlem
 - Metylenová modř
 - Barvení stříbrem

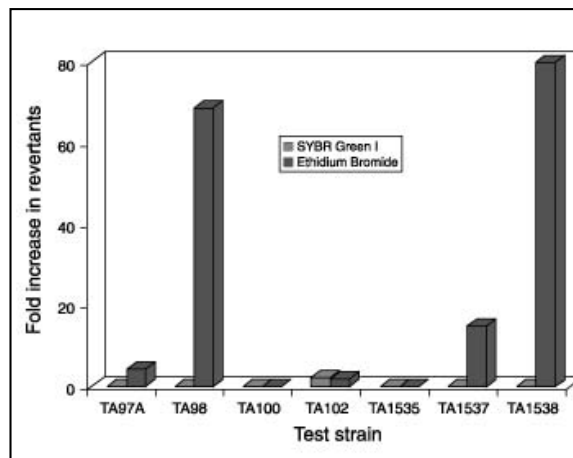
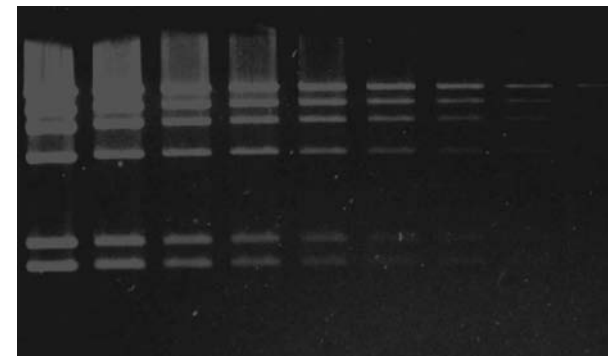
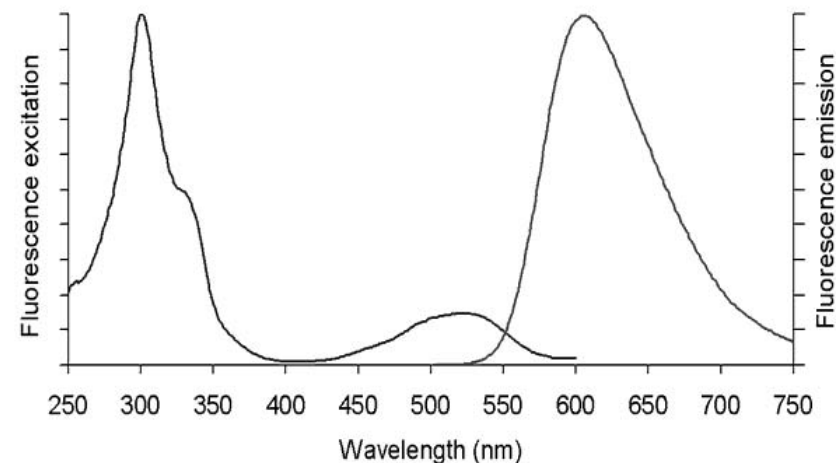
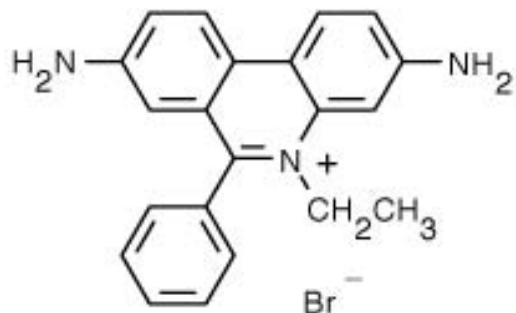
• Kyaninová barviva

- Původní patentovaná
 - Pro barvení gelů
 - SYBR Gold
 - SYBR Green I
 - SYBR Green II
 - Pro kvantifikaci
 - PicoGreen
 - OliGreen
 - RiboGreen
- Pro buňky impermeabilní s vysokou citlivostí
 - TOTO, TO-PRO a SYTOX
- Pro buňky permeabilní
 - Cytologická barviva SYTO
- Chemicky reaktivní SYBR barviva tvořící biokonjugáty

Fenantridinová barviva – Etidium bromid

- Interkalační barviva vázající se bez sekvenční specifity na nukleové kyseliny s četností 1 molekula na 4–5 bp DNA
- Mutageny a karcinogeny
- EtBr a PI se váže jak na DNA, tak na RNA
- Po vytvoření komplexu EtBr-DNA je pozorována $\sim 20 - 30 \times$ vyšší fluorescence
- Citlivost 1-5 ng DNA, 5 ng RNA (254 nm)
- Polyakrylamid zhasí fluorescenci EtBr, není možné detekovat méně jak 10 ng DNA

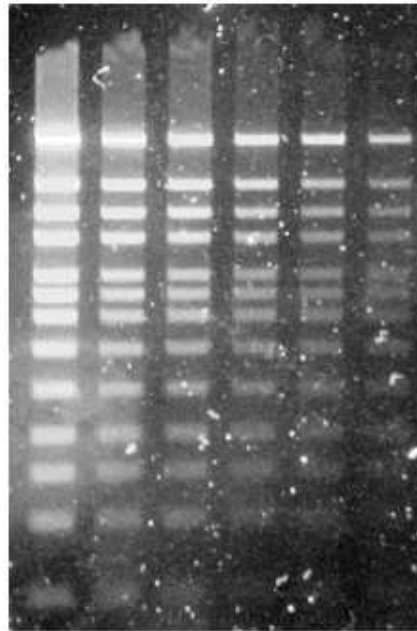
Etidium bromid (fenantridinium, 3,8-diamino-5-etyl-6-fenyl-bromid)



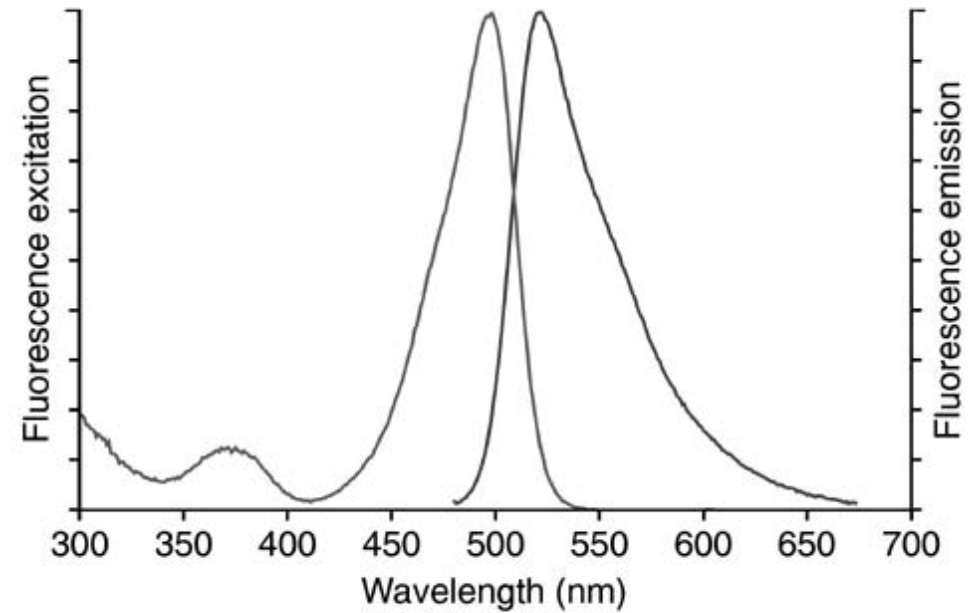
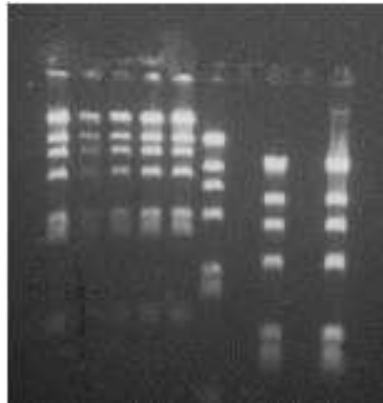
Srovnání výsledků
Amesova testu
u EtBr a SYBR

Komerční kyaninová barviva - SYBR® Green a SYBR® Gold

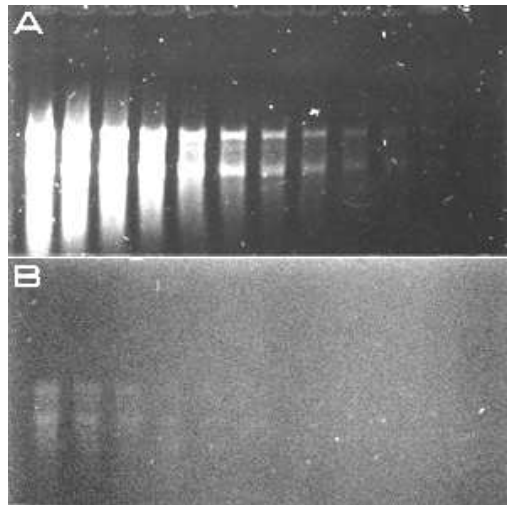
SYBR Gold



SYBR Green I



SYBR



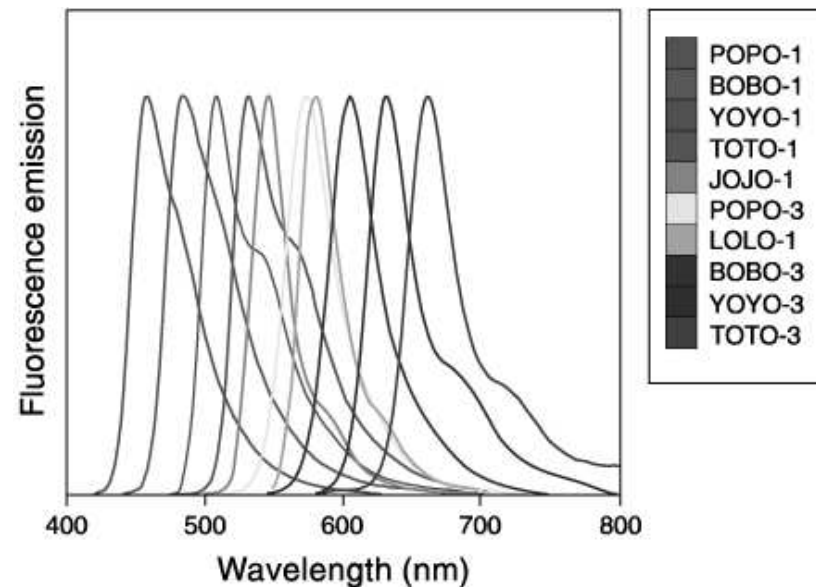
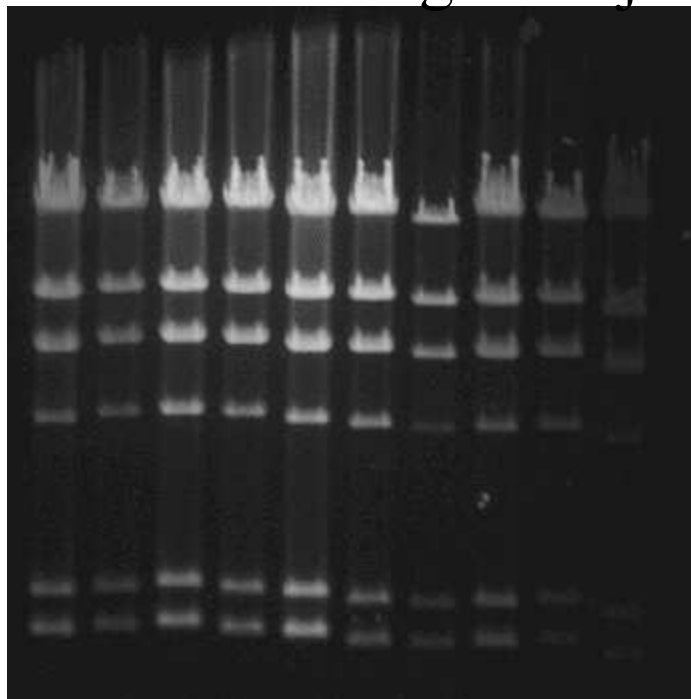
EtBr

- vysoká afinita k NA
- 1000× vyšší fluorescence po vazbě na NA
- 25 – 100 × citlivější než EtBr
- Vhodná pro ds DNA, ssDNA a RNA
- 60 pg dsDNA nebo 1 ng RNA (při 300 nm)
- mnohem méně mutagenní než EtBr

Dimerní kyaninová barviva s vysokou afinitou k NA

a b c d e f g h i j

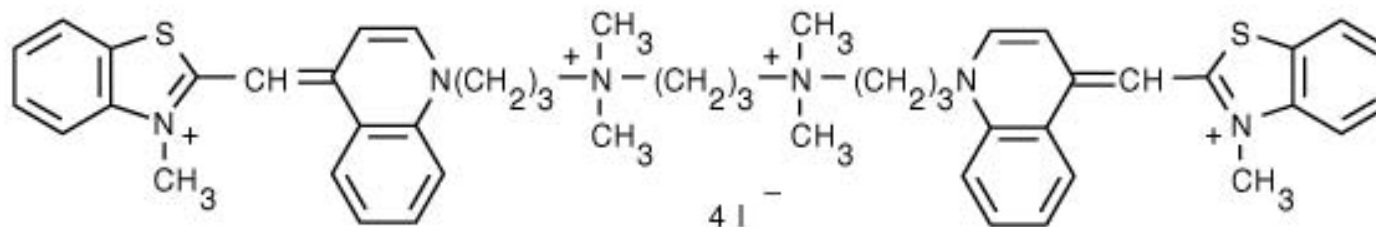
- a. POPO-1
- b. BOBO-1
- c. YOYO-1
- d. TOTO-1
- e. JOJO-1
- f. POPO-3
- g. LOLO-1
- h. BOBO-3
- i. YOYO-3
- j. TOTO-3



Citlivost 15 – 50 pg dsDNA (300 nm)

TOTO-1

chinolinium, 1-1'-[1,3- propandiyl bis[(dimetyliminio)-3,1- propandiyl]]bis[4-[(3-metyl-2(3H)- benzotiazolylden)metyl]] tetrajodid



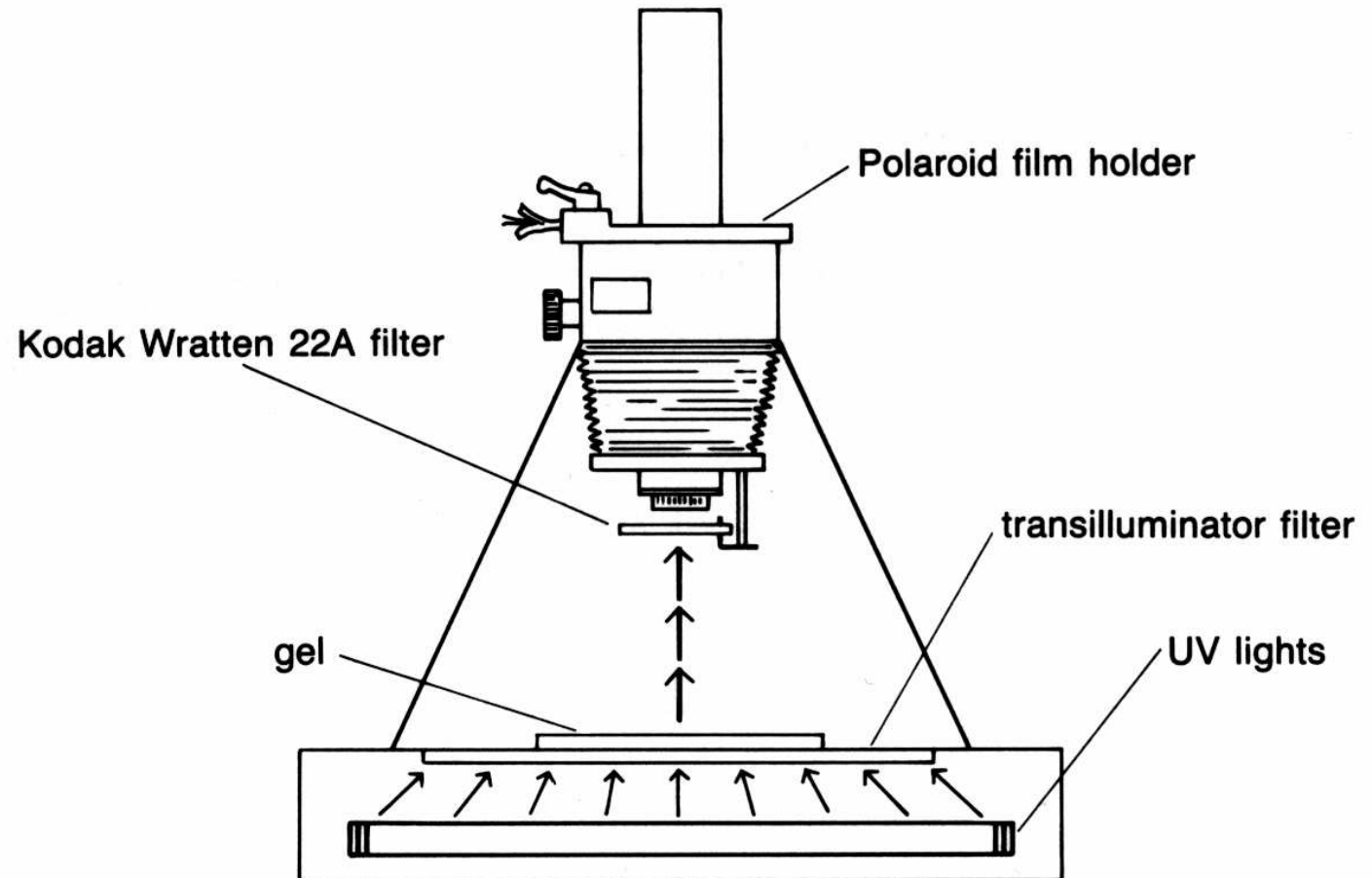
Barvení stříbrem

- Barvení NA stříbrem má mírně vyšší citlivost než barvením EtBr
- Citlivost 100 pg DNA v PA
- dsDNA, ssDNA i RNA
- Lepší citlivost vykazuje u **polyakrylamidových gelů** než u agarózových
- Barvení zahrnuje 3 kroky:
 - Fixace (metanol, ledová kyselina octová a glycerol)
 - Barvení (uhličitan sodný, dusičnan amonný, **dusičnan stříbrný** a kyselina wolframovokřemičitá)
 - Zastavení (ledová kyselina octová)



Dokumentace

- Používané vlnové délky UV-světla
 - 254 nm
 - 302 nm
 - 365 nm



Metody izolace DNA z gelu

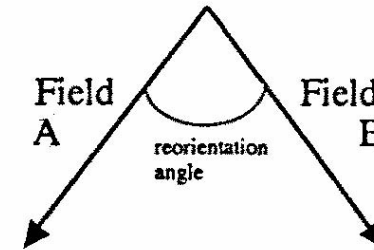
- Elektroeluční
- Vymražování
- Zachycení na membránu
- Agaráza – enzym degradující agarózu
- Fenolová extrakce po roztavení v LMT agaróze
- Pasážování přes DEAE-Sephacel
- Komerční kity s purifikací na kolonkách

Pulzní gelová elektroforéza

- Při konvenční gelové elektroforéze se molekuly DNA pohybují od katody k anodě přímočaře a plynule a rychlost pohybu je úměrná jejich velikosti.
- Rozdělení molekul je podmíněno rychlejším průchodem menších molekul pórovitou strukturou gelové matrice.
- Tento princip separace se uplatňuje u molekul DNA do velikosti přibližně 50 kb.
- Větší molekuly se pohybují stejnou rychlostí a nerozdělí se.
- K jejich separaci se využívá pulzní gelová elektroforéza.
- Gel vystaven elektrickému poli, jehož směr se pod určitým úhlem ($90-180^\circ$) v časových intervalech periodicky mění.
- Aby se molekuly DNA mohly pohybovat ve směru změněného elektrického pole, musí nejdříve změnit svou orientaci.
- Větší molekuly DNA spotřebují na svou reorientaci více času než molekuly menší a jejich výsledný přímočarý pohyb je proto pomalejší.
- Techniky pulzní elektroforézy se využívá k separaci neporušených molekul DNA (např. chromozomů kvasinek) nebo restričních fragmentů o velikosti několika megabází. Horní limit velikosti separovaných molekul je 6 000 – 10 000 kb.

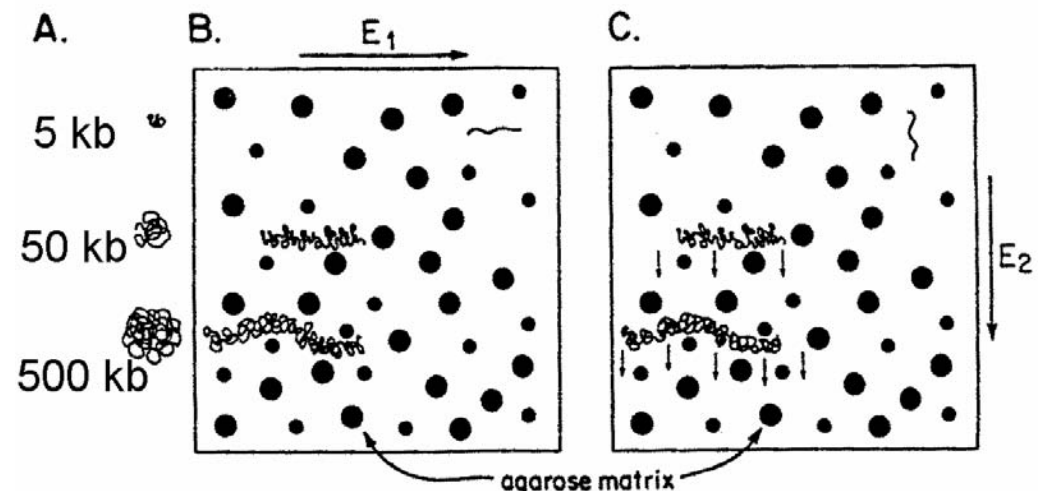
Základní termíny týkající se PFGE

- **Pulzní pole** (pulsed field).
Elektroforetický proces, který používá více než jedno elektrické pole, a ve kterém se elektrická pole střídavě aktivují.
- **Pulzní interval** (switch interval, switch time, pulse time). Čas, po který je každé ze střídajících se elektrických polí aktivováno.
- **Reorientační úhel** (reorientation angle). Úhel mezi dvěma střídajícími se elektrickými poli, tj. úhel mezi různými směry, ve kterých molekuly DNA putují.
- **Homogenní pole** (homogeneous field). Elektrické pole, které má uniformní potenciálové rozdíly po celém poli.

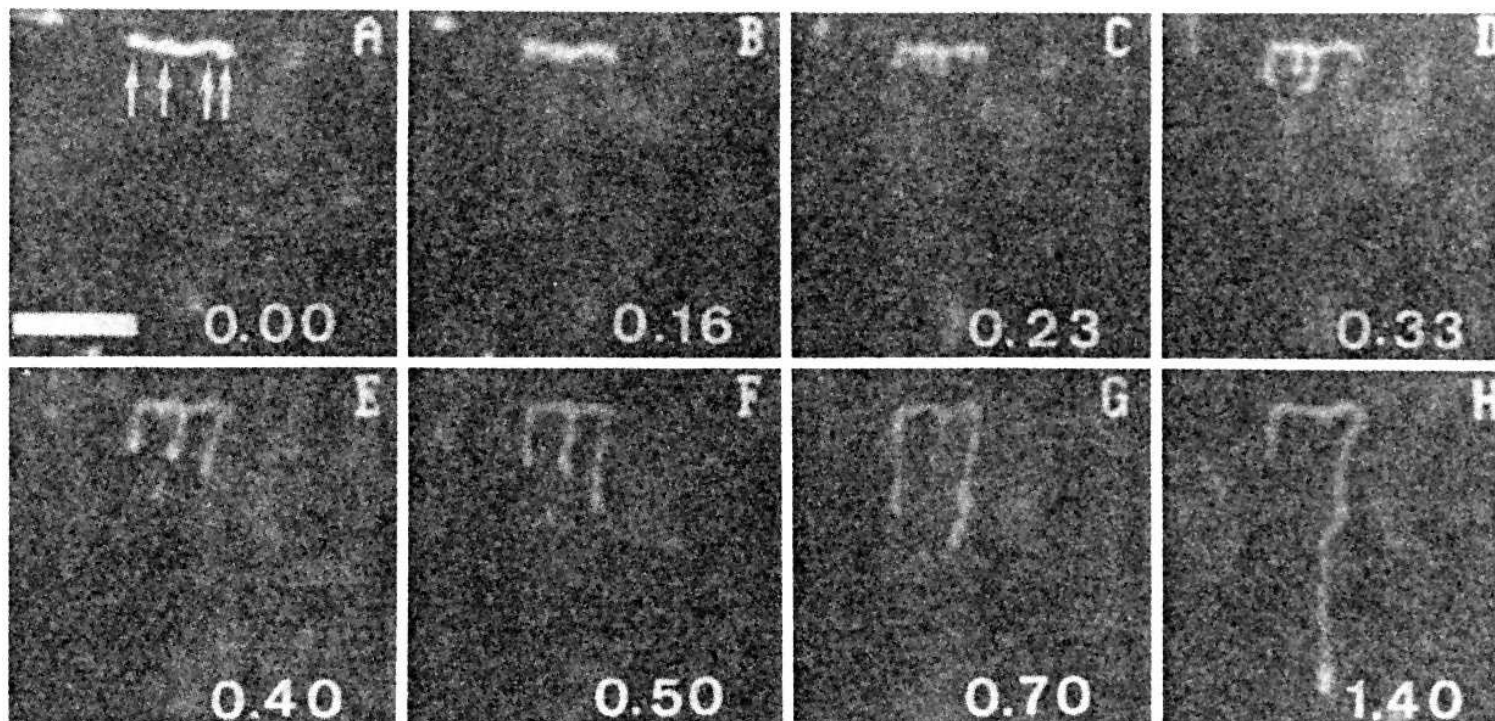


Princip separace molekul v pulzním poli

- A. Molekuly DNA o různých velikostech v prostředí bez elektrického pole
- B. Separace molekul v konvenční gelové elektroforéze (molekuly o velikosti 50 - 500 kb se pohybují stejnou rychlostí)
- C. Při pulzní elektroforéze je elektrické pole E_1 přerušeno a nahrazeno polem E_2 v jiném směru. Aby mohla DNA ve směru druhého pole migrovat, musí se nejdříve reorientovat ve směru u nového pole. Čím jsou molekuly větší, tím delší dobu spotřebují ke své reorientaci, a dochází tak ke zpomalení jejich pohybu.
- Pokud jsou obě pole stejná (směr, napětí, pulzní časy), bude výsledná dráha pohybu přímá, složená z jednotlivých "cik-cak" kroků.

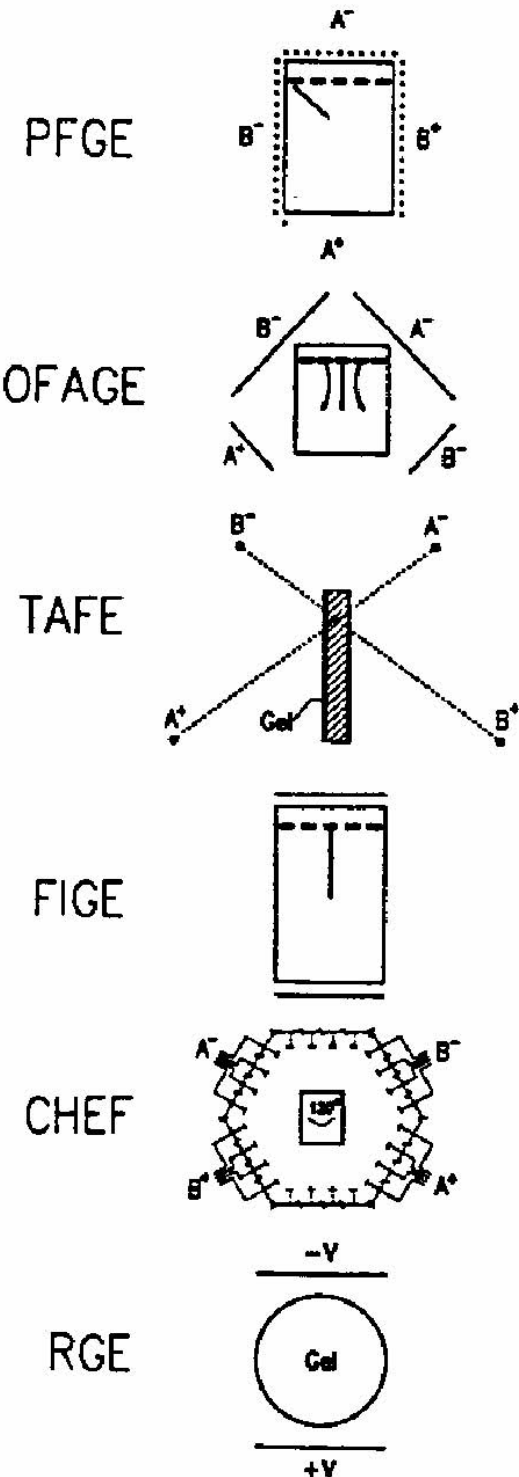


Pohyb DNA v agarózovém gelu při PFGE

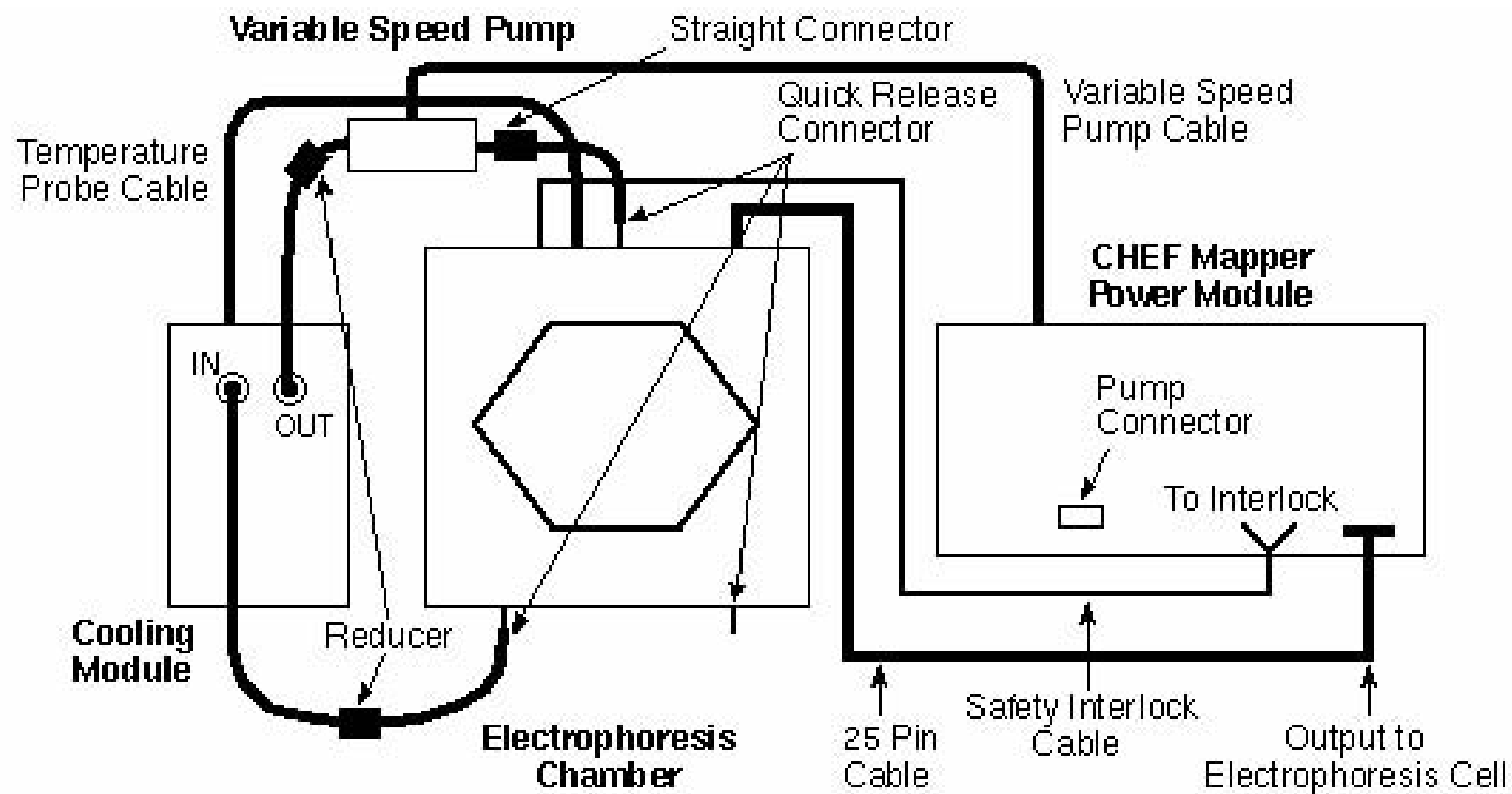


Označení systémů používaných pro pulzní elektroforézu

- **PFGE**
Pulsed Field Gel Electrophoresis
- **OFAGE**
Orthogonal Field Alteration Gel Electrophoresis
- **TAFE**
Transverse Alterating Field Electrophoresis
- **FIGE**
Field Inversion Gel Electrophoresis
- **CHEF**
Clamped Homogenous Electric Field Electrophoresis
- **RGE**
Rotating Gel Electrophoresis
- **ZIFE**
Zero-Integrated Field Electrophoresis
- **PHOGE**
Pulsed Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis



Součásti aparatury pro PFGE



Faktory ovlivňující separaci molekul DNA při PFGE

- Napětí
- Typ agarózy
- Koncentrace agarózy
- Teplota
- Typ pufru (TAE- rychlejší migrace, TBE- pomalejší)
- Reorientační úhel
- Pulzní časy
- Zařazení sekundárních pulzních časů nebo přerušení

Vliv reorientačního úhlu

Two-state mode
30 min switch time
2 V/cm (67 V), 14 °C, 1x TAE
48 hour time
0.8% Chromosomal Grade
Agarose

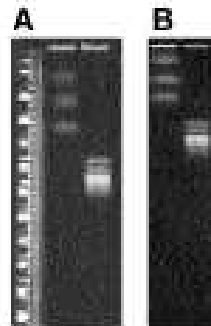


Fig. 1 Increased mobility of *S. pombe* chromosomes. A. 106° angle. B. 120° angle.

FIGE mode
180° angle
1x TAE, 14 °C
9 V/cm forward
6 V/cm reverse
Switch time 200–800 msec ramp
Forward switch time = reverse time
Run time = 18 hr
Lane 1: Bio-Rad's λ -Hind III standard
(6.6, 9.4, 23.1 kb)
Lane 2: Bio-Rad's 8–48 kb size standard
(8.3, 8.6, 10.0, 12.2, 15.0,
17.1, 19.4, 22.6, 24.8, 29.9,
33.5, 38.4, 48.5 kb)

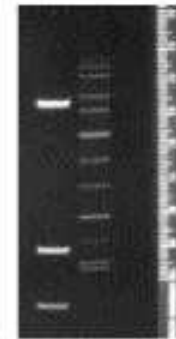
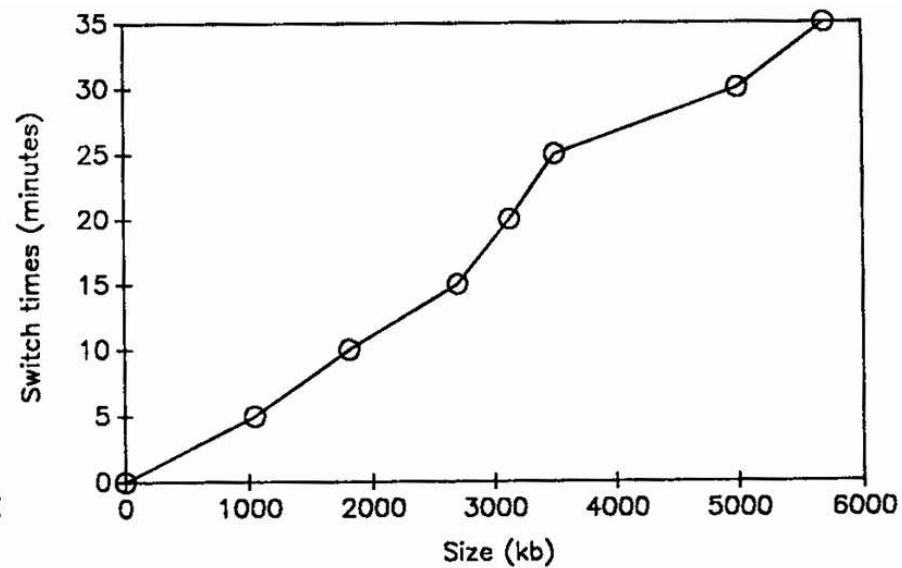
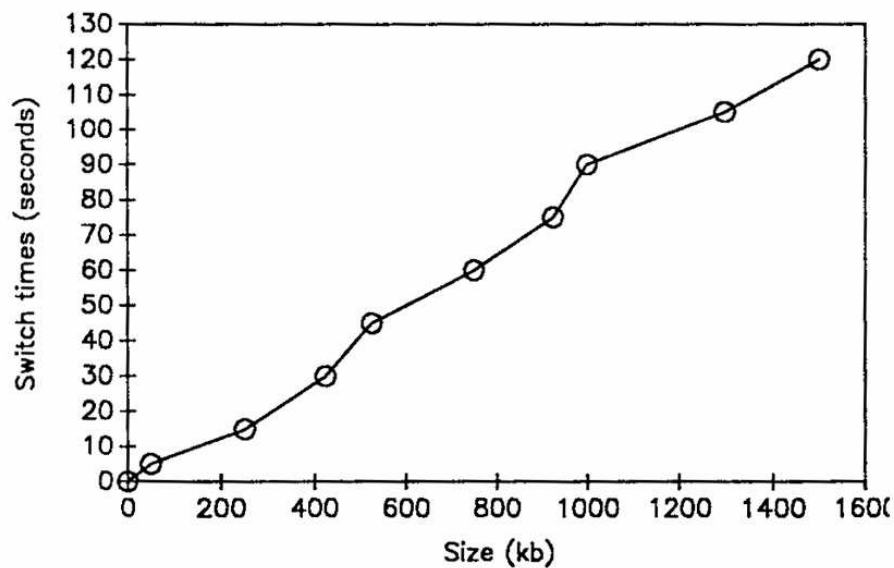
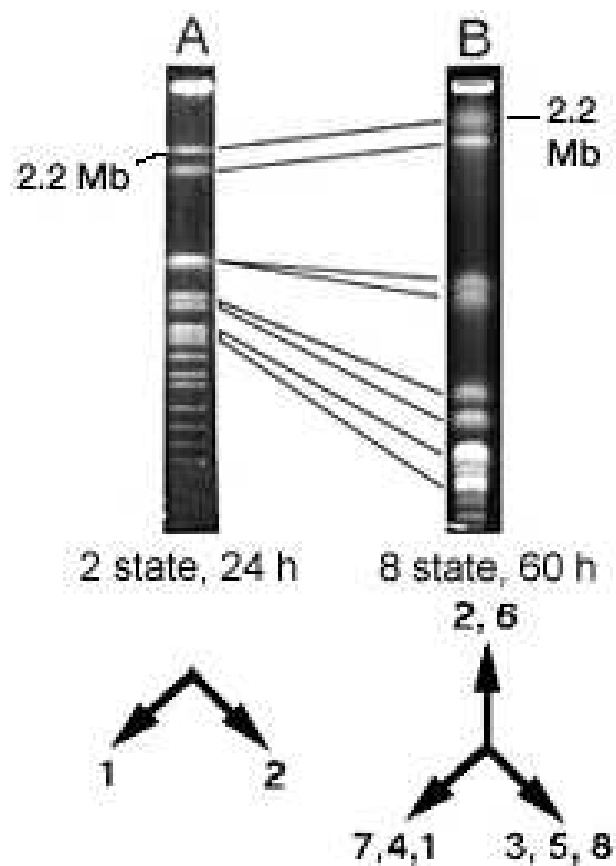
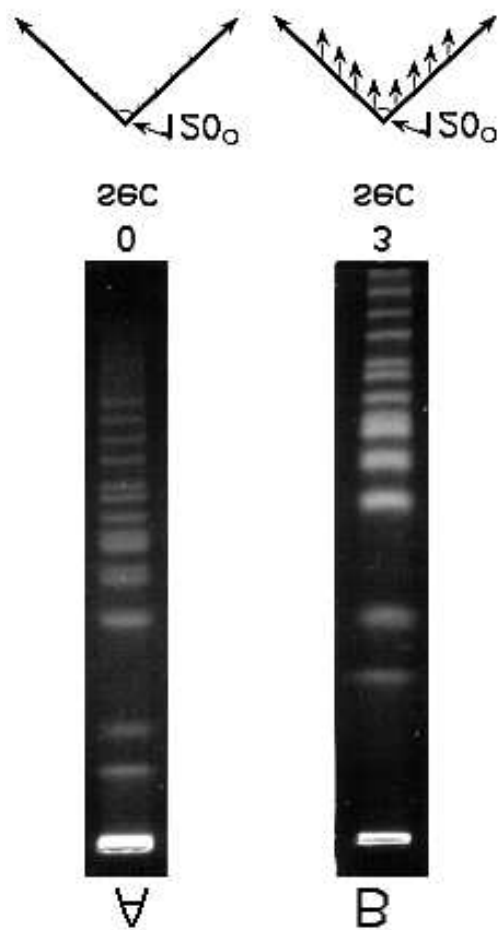


Fig. 2 High resolution of 8–48 kb size standard on the CHEF Mapper System with asymmetric voltage FIGE.

Volba pulzních intervalů v závislosti na velikosti separovaných molekul

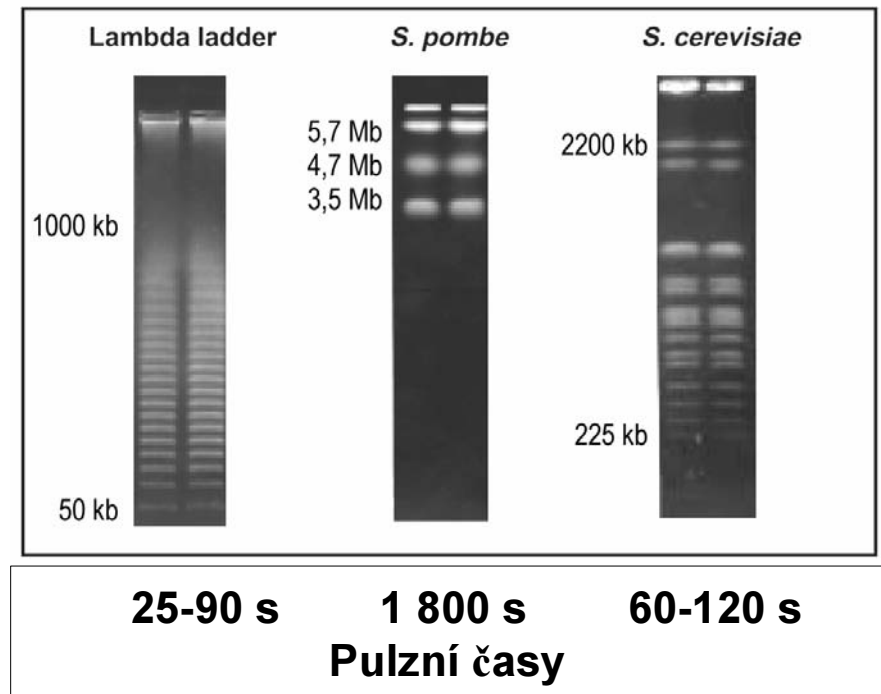


Sekundární pulzní pole



Používané standardy velikostí pro PFGE

- Konkatemery plazmidů
- Konkatemery DNA fága lambda
 - Velikost monomeru 48,5 kb
- Makrorestrikční fragmenty bakteriálních genomů
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Escherichia coli*
- Chromozomy kvasinek
 - *Saccharomyces cerevisiae* (240-2200 Kb)
 - *Schizosaccharomyces pombe* (3,5-5,7 Mb)
 - *Hansenula wingei* (1,0-3,1 Mb)
 - *Candida albicans* (1,0-4,0 Mb)
- Chromozomy *Dictyostelium discodium* (3,6-9,0 Mb)
- Chromozomy *Neurospora crassa* (4,0-10,3 Mb)



Příprava vzorků pro PFGE

- Kultivace buněk do přesně stanovené hustoty
- Smíchání buněk s roztavenou agarózou
- Nalítí směsi do malé formičky
- lyze buněk v agarózových bločcích
- deproteinace DNA
- Štěpení restriční endonukleázou, která štěpí s nízkou frekvencí (velikost fragmentů 50 - 10 000 kbp)
- Pulzní elektroforéza
- Barvení gelu v etidiumbromidu

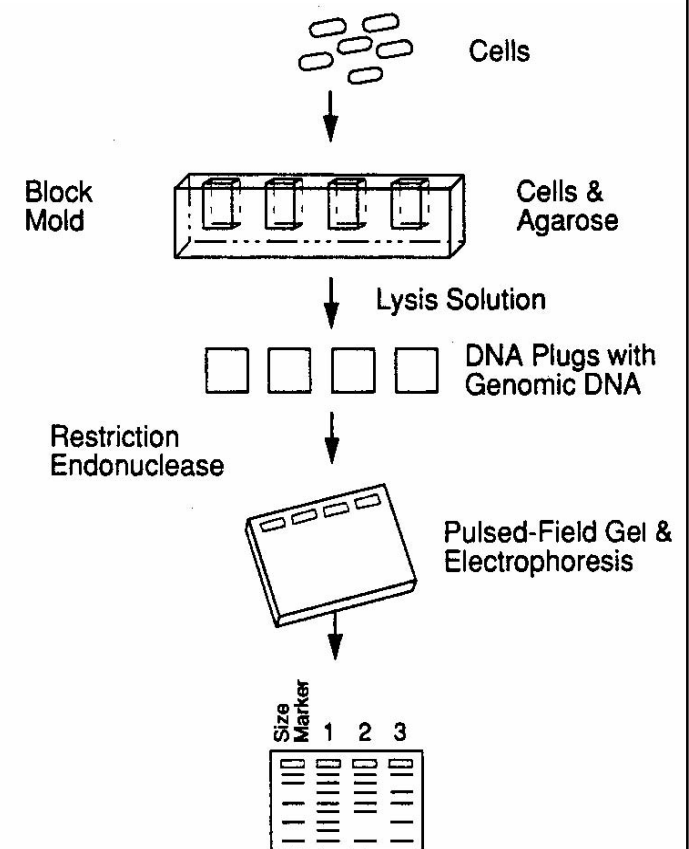
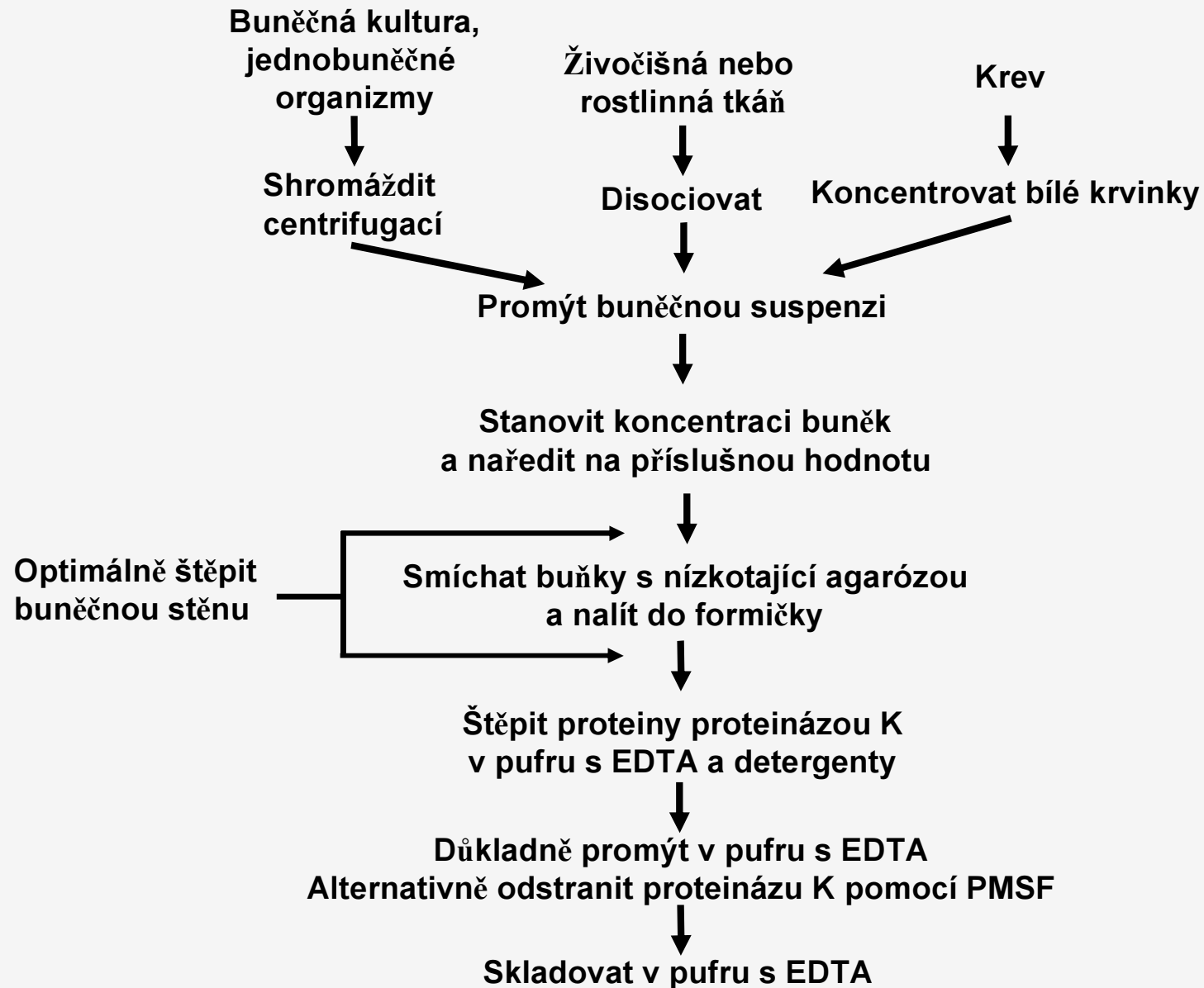


Schéma přípravy vzorků pro PFGE

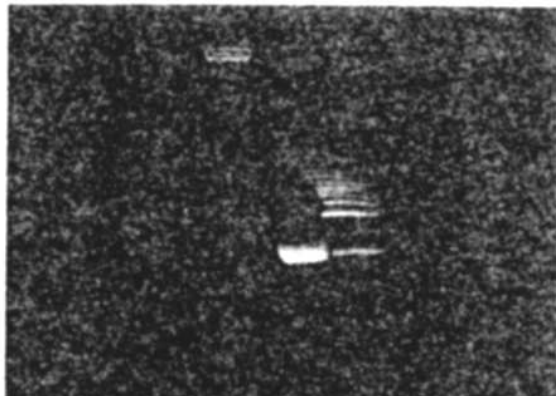


Separace kružnicových molekul DNA pomocí PFGE

- Kružnicová DNA se pohybuje v agarózových gelech velice odlišně v porovnání s lineární DNA. Také na změny parametrů pulzní elektroforézy reaguje kružnicová DNA odlišně

1.5 V/cm
24 sec

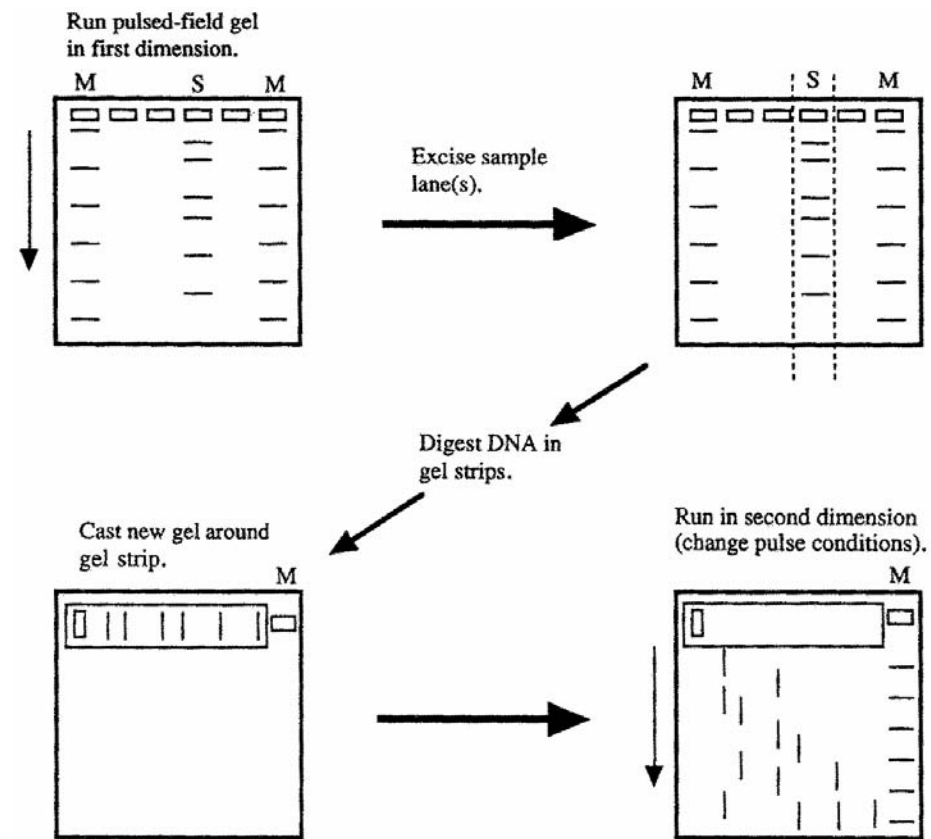
7 V/cm
5.14 sec



Příklad separace směsi konkatemerů lineární DNA a monomeru kružnicové DNA v superhelikálním stavu. Při použití dvou různě silných polí putují lineární molekuly v jedné dráze, kdežto kružnicové z této dráhy vybočí.

Dvourozměrná pulzní gelová elektroforéza

- Preparativní a dvourozměrná PFGE má využití zejména při konstrukci makrorestrikčních map



Řešení problémů při PFGE

Problémy při izolaci

— nanášení vzorku — štěpení RE — nastavení PFGE

