

# **Analýza nukleových kyselin pomocí elektromigračních metod**

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2013**

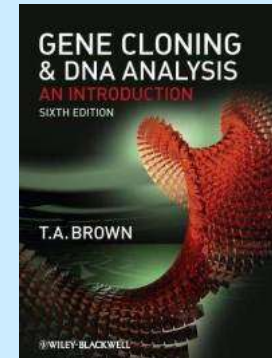
# ***Obsah přednášky***

- 1) Elektroforéza – základní informace**
- 2) Typy elektroforéz**
- 3) Stanovení velikosti fragmentů elektroforézou**
- 4) Různé typy barvení gelů**
- 5) Pulsní gelová elektroforéza**
- 6) Denaturační elektroforéza**
- 7) Kapilární elektroforéza**

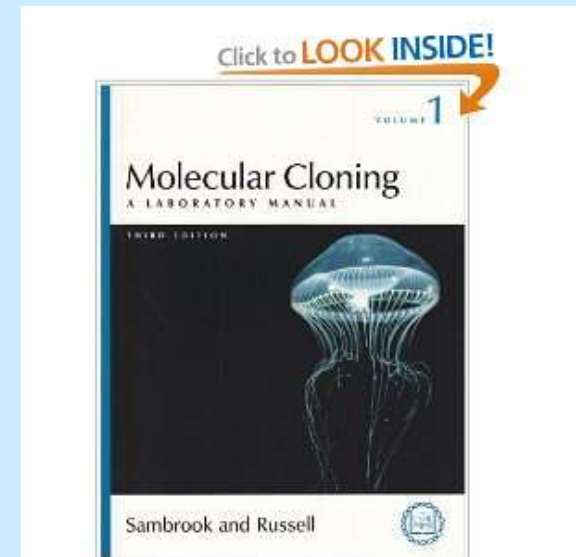


## ***Doporučená literatura***

**Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition**



**Sambrook and Russell (2001): Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA**



**V červnu 2012 vyšlo 4. vydání**

**– autoři Green and Sambrook**

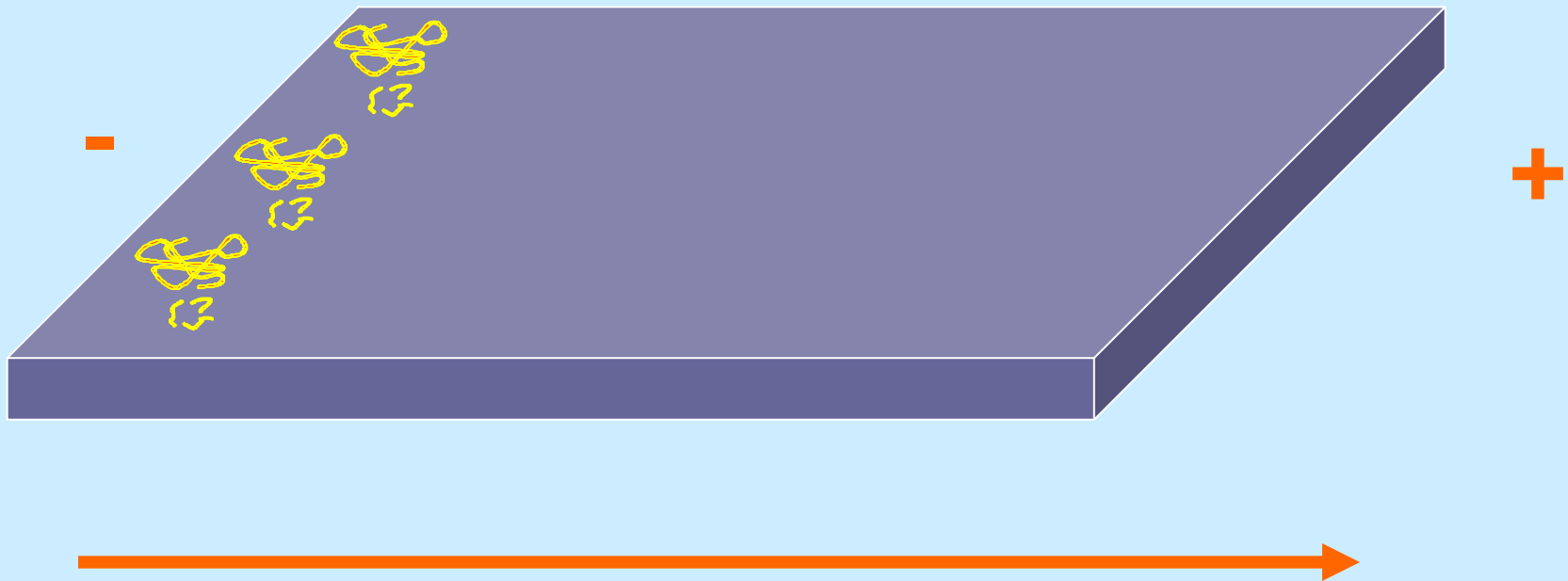
# ***Elektroforéza nukleových kyselin***



# *Princip elektroforézy*

**Pohyb nabitých molekul v elektrickém poli**

**Dělení molekul na základě rozdílných pohyblivostí, které závisí na: náboji, velikosti (hmotnosti) a tvaru**

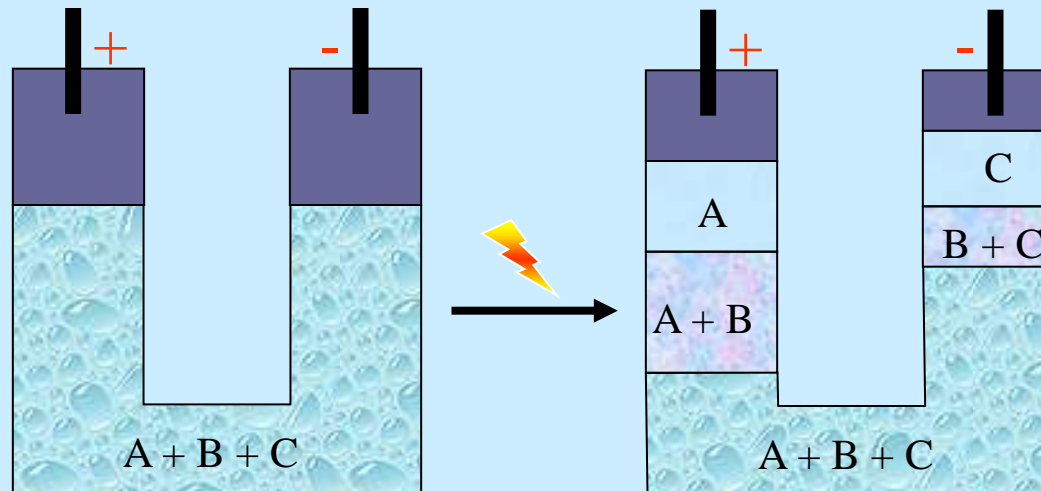


# *Dělení podle prostředí*

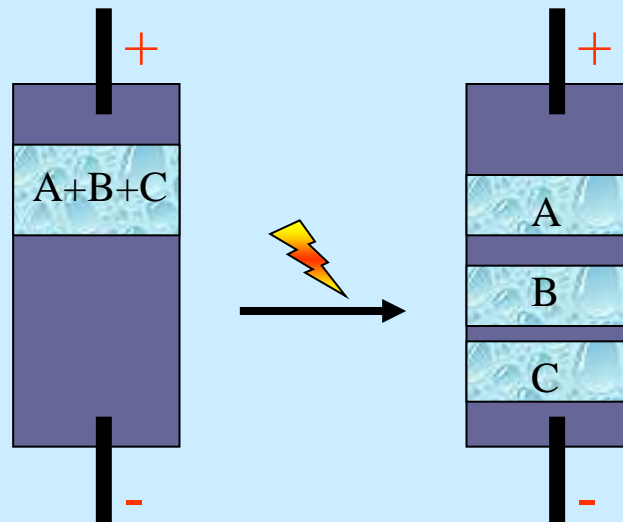
**Volná elektroforéza (v roztoku)**

**Zónová elektroforéza (na nosiči, gelová)**

# *Volná elektroforéza*



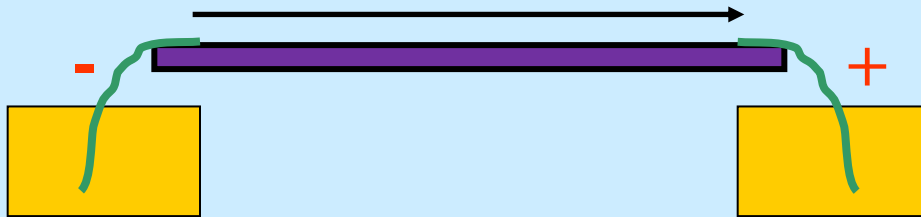
# Zónová elektroforéza



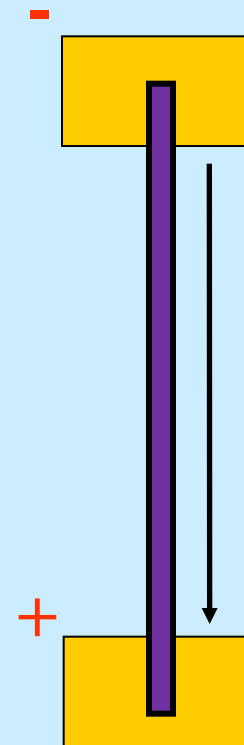


# Dělení podle uspořádání

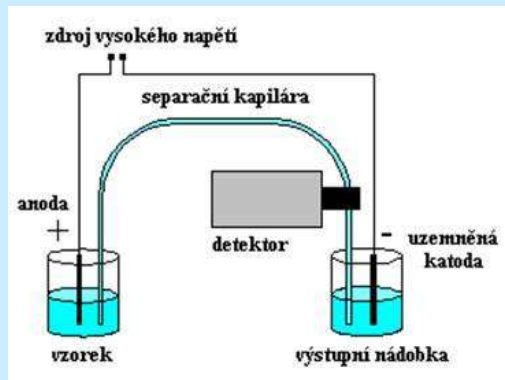
## Horizontální



## Vertikální



## Kapilární

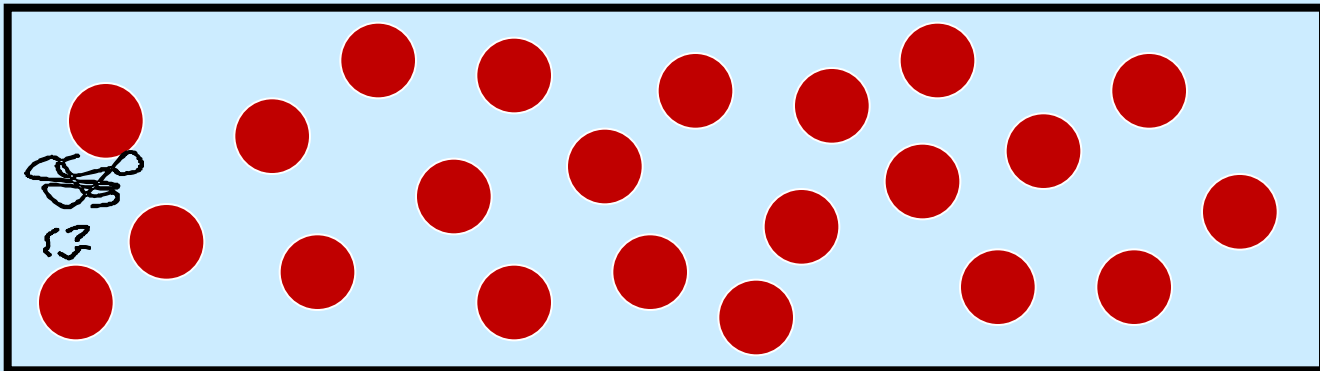


# ***Vlastnosti elektroforézy***

- **Z praktických důvodů se elektroforéza neprovádí přímo v roztoku, ale na vhodném nosiči (většinou gel)**
- **Pro přípravu gelu jsou výhodné látky, které samy gelují a mají různou porozitu v závislosti na koncentraci gelu**

# *Gely a pohyb částic v nich*

- agaróza nebo polyakrylamid
- síťovitá struktura – koncentrace polymeru
- agarózové gely = stovky až 50 kbp
- polyakrylamid = 10 až 1 000 bp



# *Co musí splňovat gely*

- **Homogenní**
- **Inertní, tj. bez nespecifických interakcí**
- **Mechanicky pevné**
- **Transparentní**
- **Reprodukovatelná a snadná příprava**

# ***Výhody elektroforézy***

- **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 malými množstvími nebo preparativně v mikrogramových množstvích**
- **Rozdělené molekuly lze snadno prokázat a ve funkční formě izolovat z gelu**

# ***Elektroforéza nukleových kyselin***

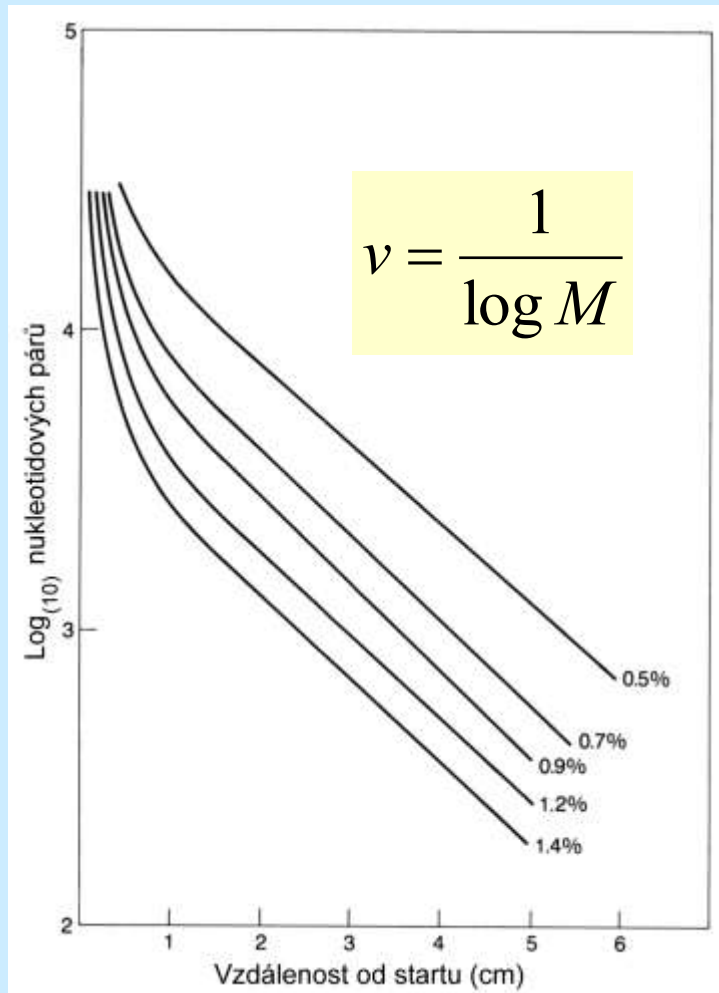
## **Optimální velikost separovaných molekul**

- **agarózové gely 100 bp až 50 000 bp**
- **polyakrylamidové gely 10 až 1 000 bp**

## **Rychlost pohybu makromolekul**

- **je nepřímo úměrná logaritmu velikosti molekul  
=> nutné porovnání s velikostními standardy**

# Vztah mezi velikostí DNA a pohyblivostí při elektroforéze



Čím menší molekula,  
tím dál uběhne



Pohyblivost závisí na  
hustotě gelu

# *Zkuste stanovit*



**257 bp**

**Elektroforézu budeme dělat ve cvičení  
a tam si i započítáte, teď si zkuste  
velmi jednoduchou úlohu**

**Zadání je zde**

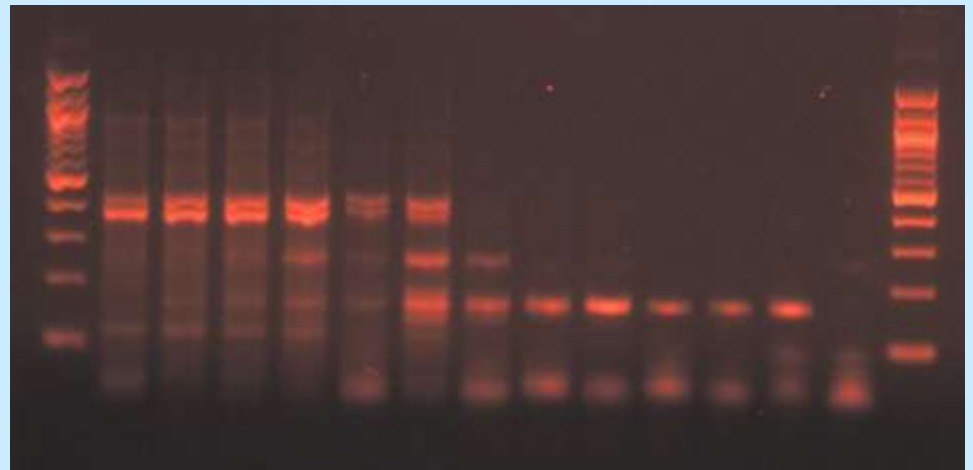


**Dokument  
ikace Microsoft W**



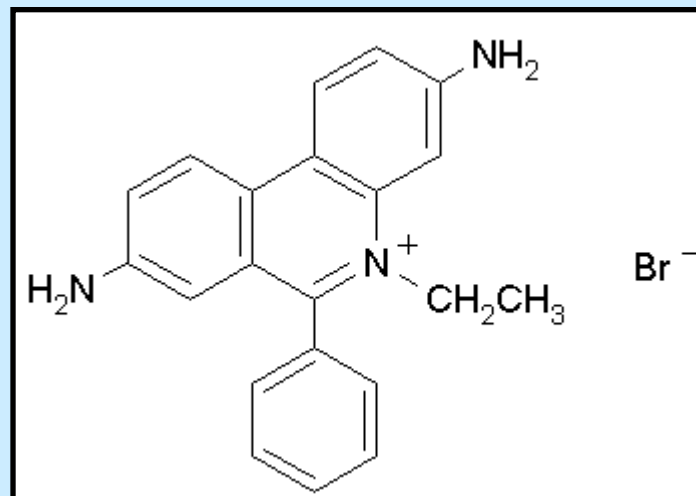
# Vizualizace nukleových kyselin

- ethidiumbromid
- SYBR GREEN
- stříbro



UV (256,312nm)

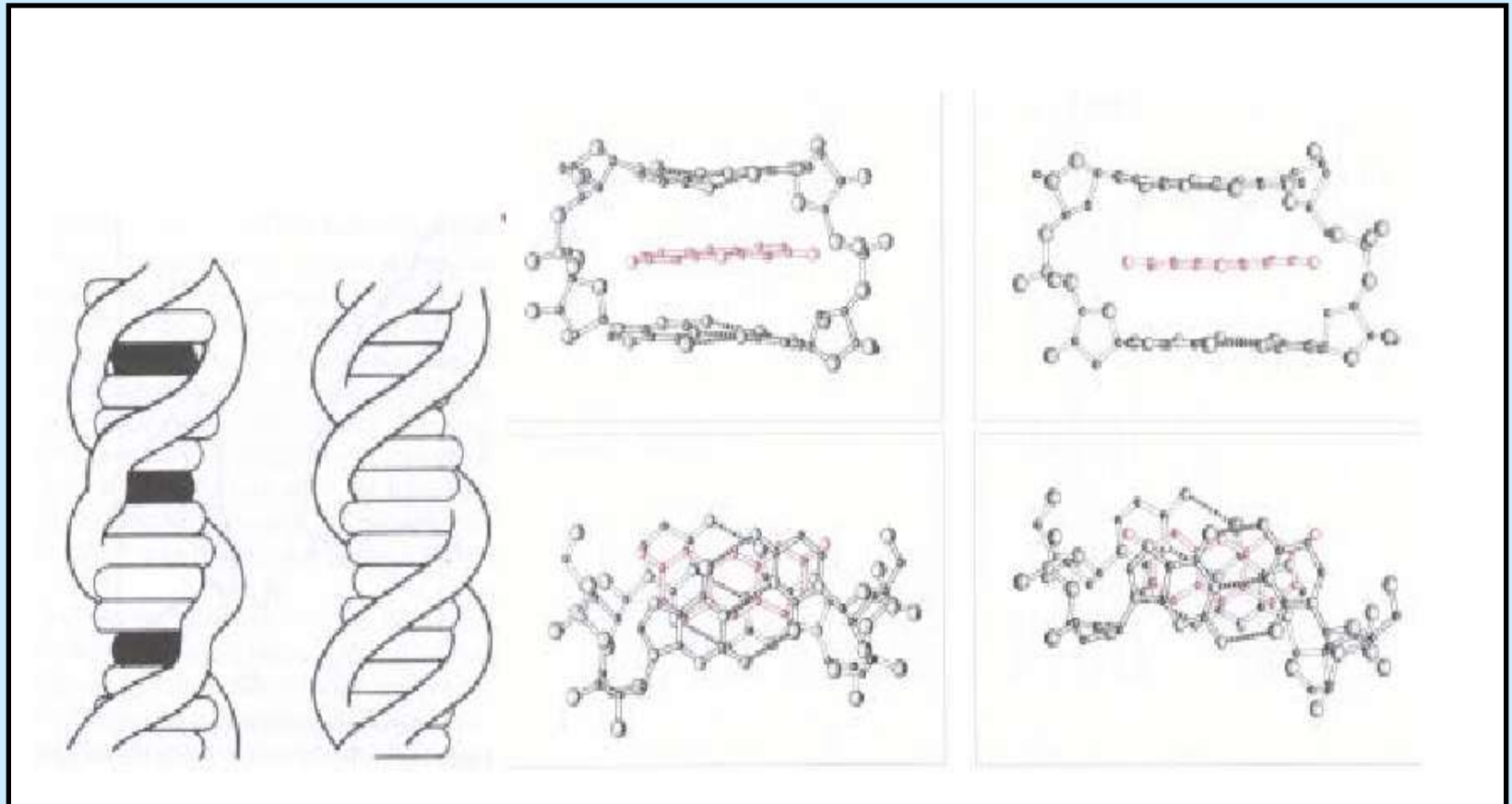
590nm



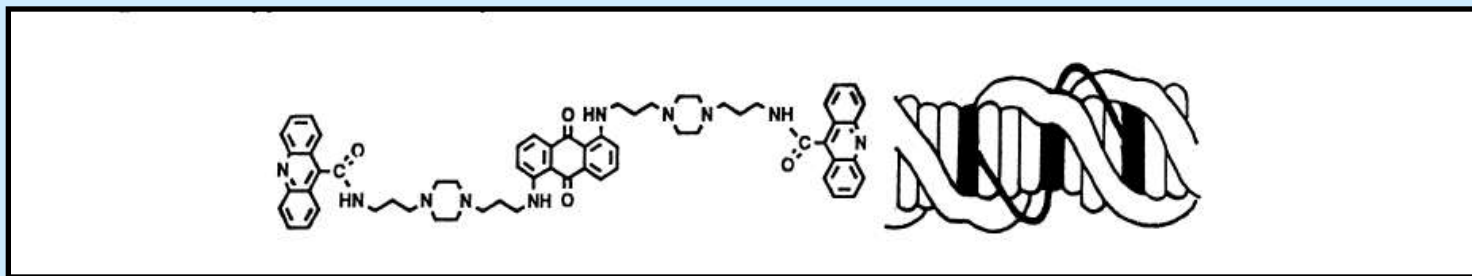
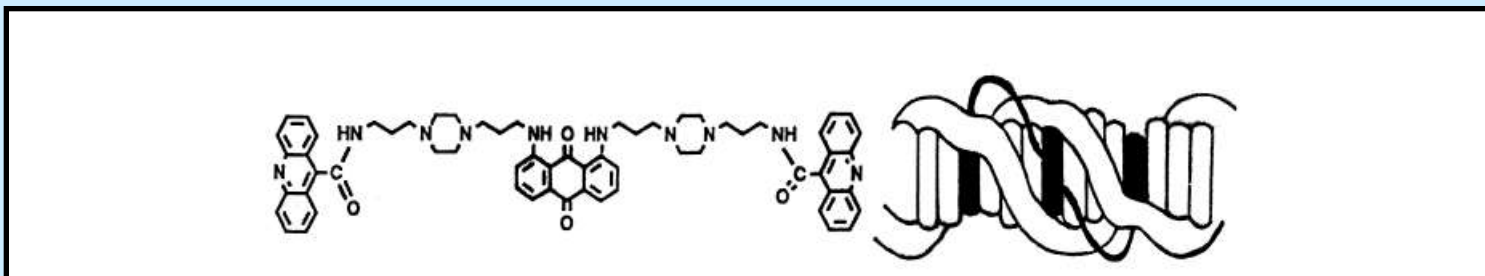
# ***Vlastnosti ethidiumbromidu***

- **Váže se jak na DNA, tak i na RNA**
- **Po vytvoření komplexu EtBr-DNA je pozorována ~20 - 30 × vyšší fluorescence**
- **Citlivost 1-5 ng DNA, 5 ng RNA (256 nm)**
- **Polyakrylamid zhasí fluorescenci EtBr, není možné detekovat méně jak 10 ng DNA**

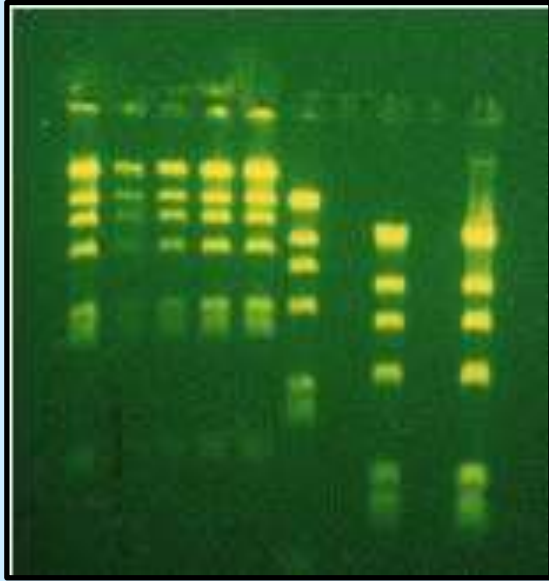
# *Interkalace ethidiumbromidu*



# Navlékání interkalátorů



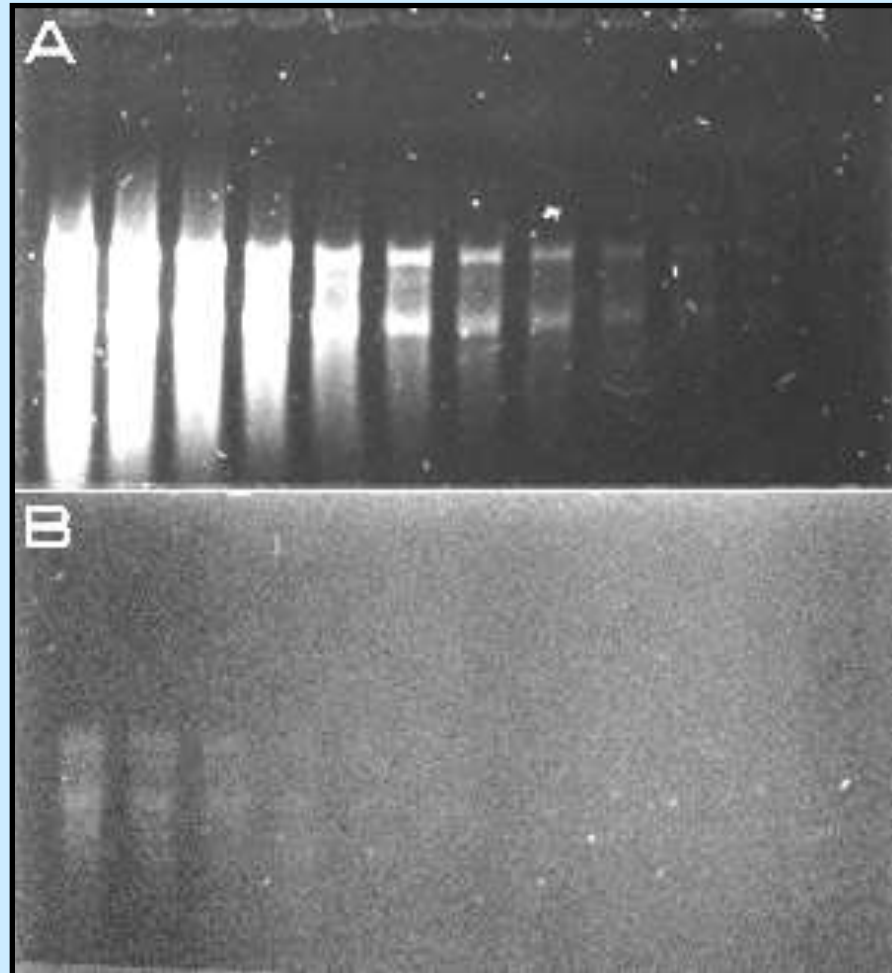
# *Barvivo SYBR Green I*



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

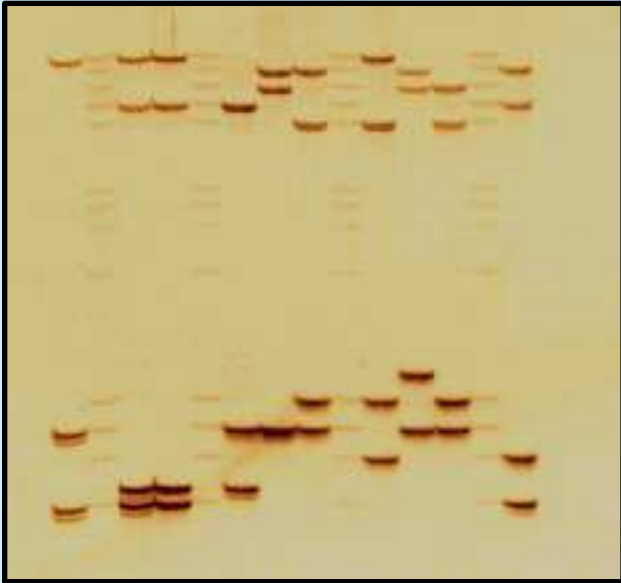
# *Srovnání citlivosti SYBR Green I a EtBr*

SYBR



EtBr

# Barvení stříbrem



➤ vhodné pro ds DNA,  
ssDNA a RNA

- Barvení NA stříbrem má mírně vyšší citlivost než barvením EtBr
- Lepší citlivost u polyakrylamidových gelů (100 pg DNA) než u agarózových

# Využití elektroforézy

- separace molekul
- studium struktury DNA
- studium interakcí mezi NA a proteiny



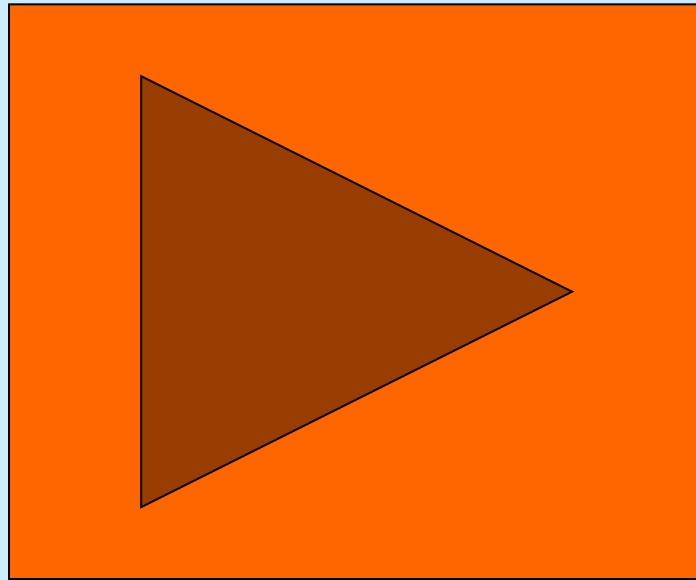
L-forma

CCC-forma



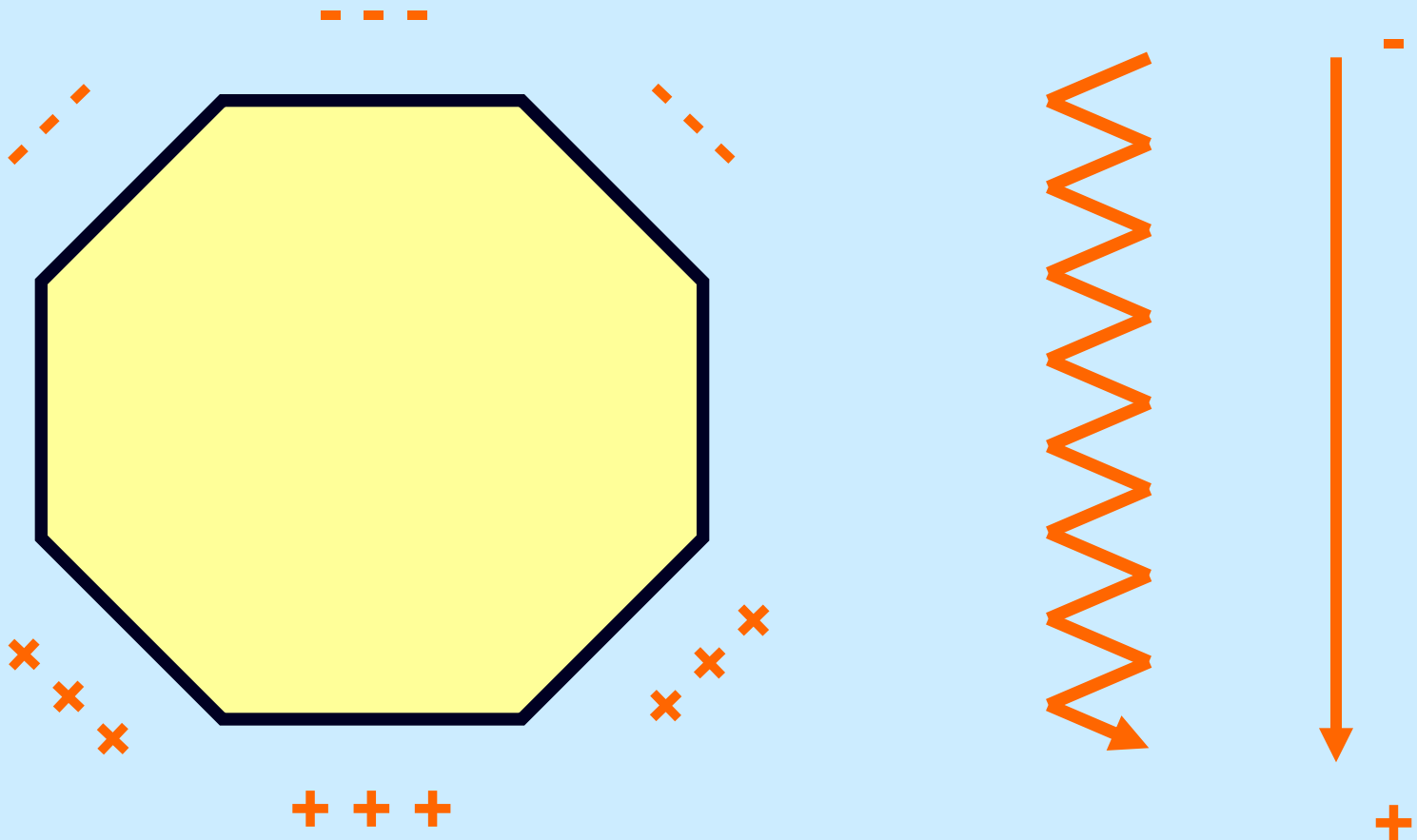
# ***Elektroforéza - animace***

**<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/animations.html>**



# *Pulsní gelová elektroforéza*

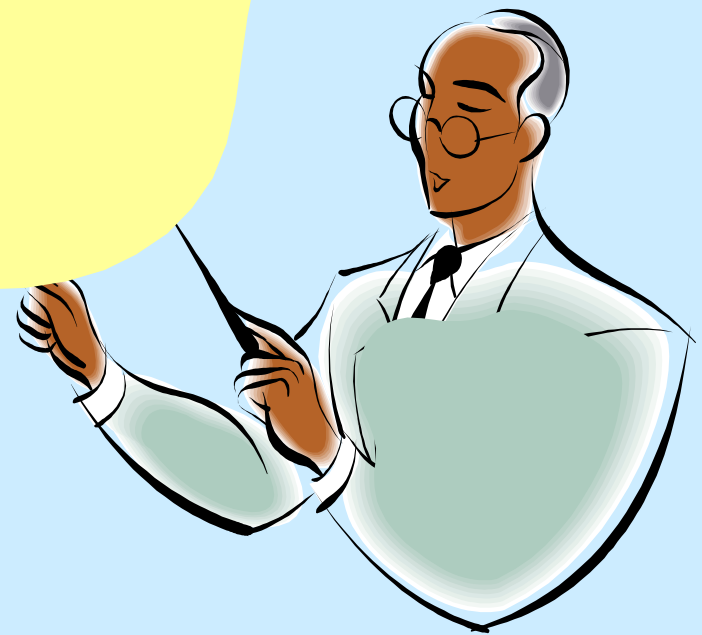
- určena k dělení velkých fragmentů DNA a chromozómů (nad 50 kbp, stovky kbp, megabáze)



# *Aparatura na PFGE*

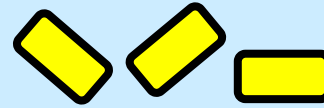


**Pěkná animace znázorňující pohyb  
DNA v pulsním poli je na  
[http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/pulse\\_field.html](http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/pulse_field.html)**

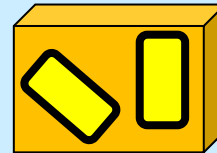


# ***Jak se provádí PFGE***

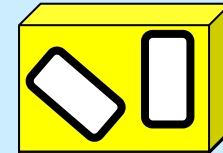
1) Buňky se naředí na vhodnou koncentraci



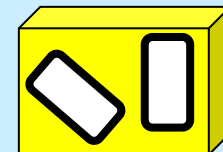
2) Buňky se zalijí do agarózy



3) Agarózové bločky se opracují enzymy – lyze, deproteinace

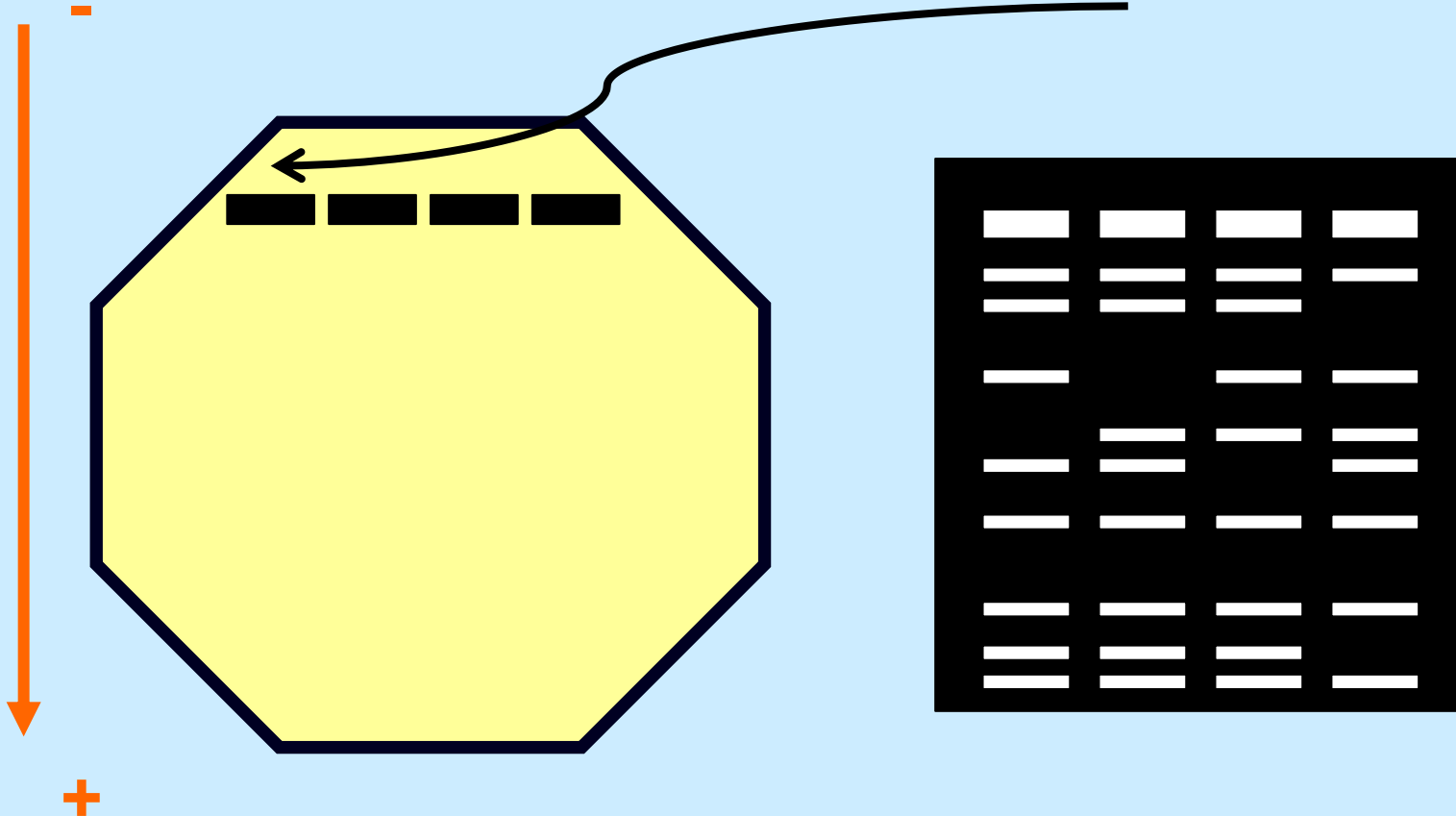
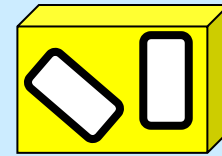


4) Na genomovou DNA v bločcích se aplikují restriktázy



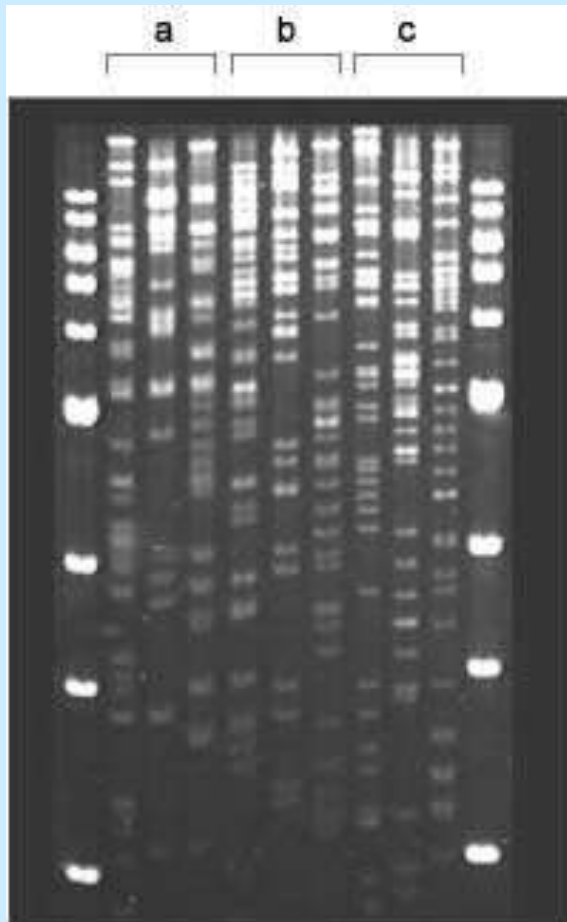
# *Jak se provádí PFGE*

5) Bločky s rozštěpenou genomovou DNA se nanesou na elektroforézu



# ***Příklad aplikace PFGE***

**Diferenciace mykobakterií po štěpení *NotI***

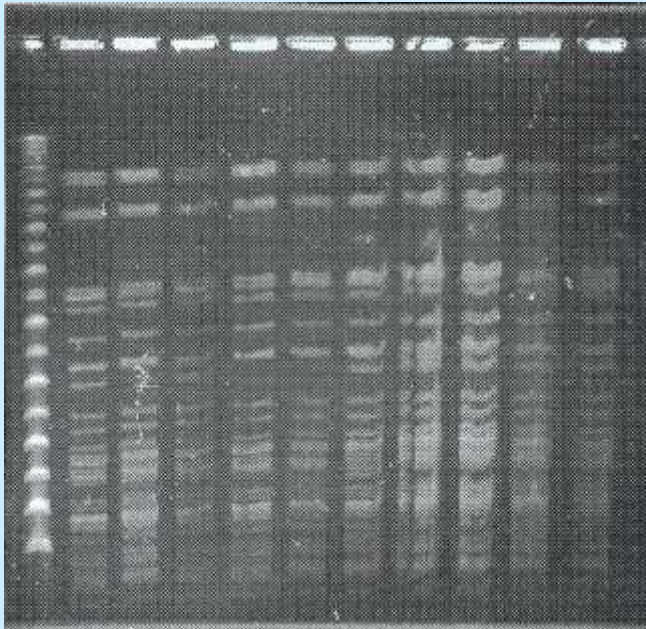


- nástroj pro epidemiology a epizootology
- stanovení fylogenetické příbuznosti
- nezbytná počítačová analýza dat

**! porovnej s RFLP !**

# ***Jiný příklad aplikace PFGE***

**Diferenciace *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* po štěpení *SnaBI*, *SpeI***



- **Pokus odlišit RFLP typy B-C1**

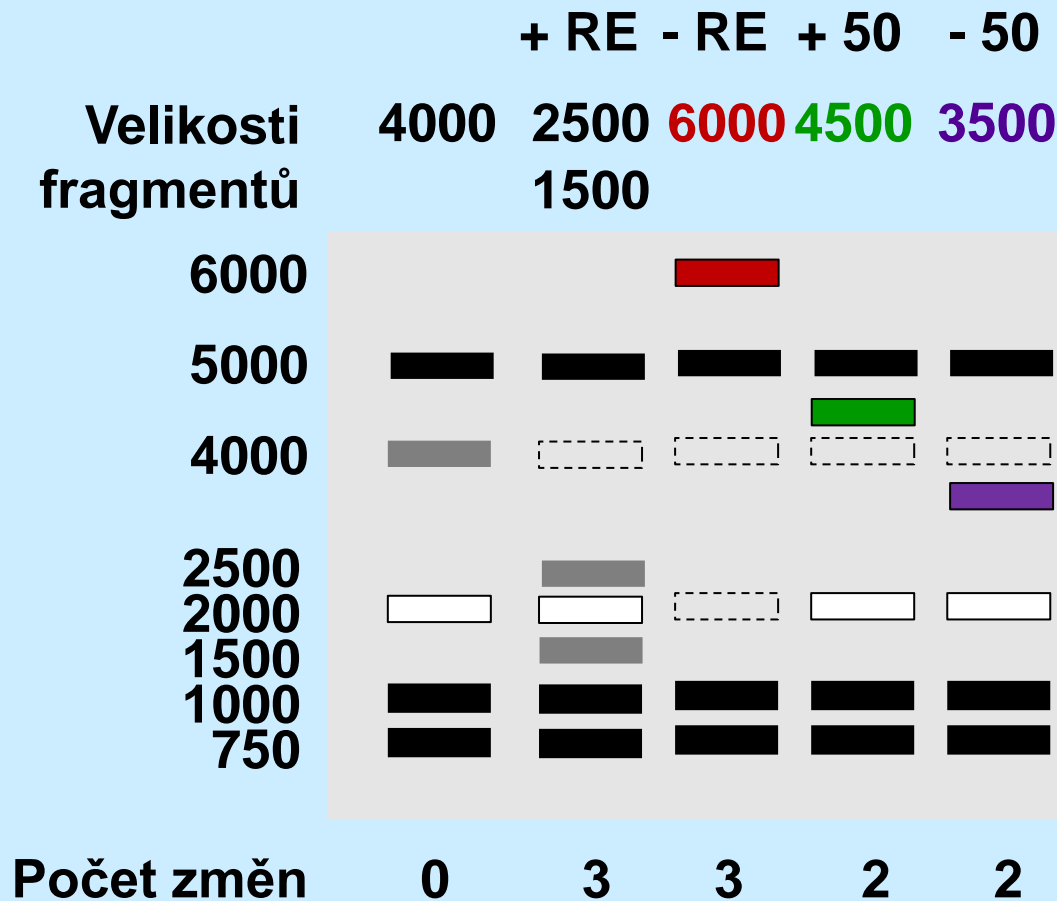
**Diferenciace *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* po štěpení *XbaI*, *DraI***

- **Studium genetické diversity kmenů izolovaných u pacientů s AIDS**



# Jak se vyhodnocují fragmenty získané po PFGE?

Analýza změn ve fragmentu 4 000 bp



# ***Vliv mutace na RFLP spektrum***

## **Mutace**

## **Výsledek**

- **bodová +RE**
  - **bodová -RE**
  - **inzerce**
  - **delece**
- **ztráta fragmentu + 2 nové**
  - **ztráta 2 fragmentů + 1 větší nový**
  - **stejný počet fragmentů, ale jeden se „prodlouží“ o délku inzerce**
  - **stejný počet fragmentů, ale jeden se „zkrátí“ o délku delece**

# *Kritéria pro epidemiologii*

Kategorie	Počet genetických změn	Počet změn v PFGE	Epidemiologie
Neodlišitelné	0	0	Součást ohniska
Blízce příbuzné	1	2-3	Pravděpodobně (probably) součást ohniska
Asi příbuzné	2	4-6	Možná (possibly) součást ohniska
Odlišné	≥ 3	≥ 7	Mimo ohnisko

Tenover et al. (1995): Journal of Clinical Microbiology 33 (9), 2233-2239

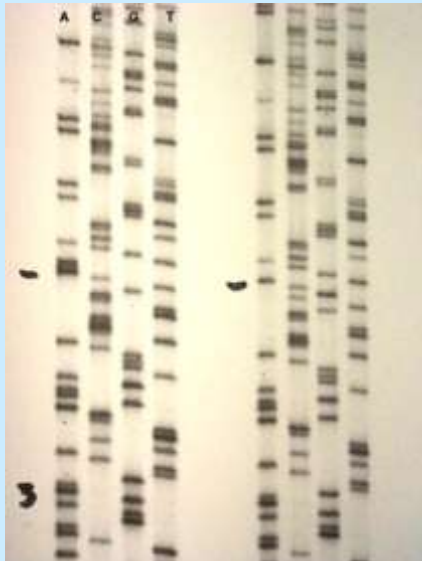
# ***Denaturační gelová elektroforéza***

- V přítomnosti **denaturačního činidla** (formamid, močovina) během elektroforézy DNA zvolna denaturuje
- Vznikají lokální větvené struktury s **jednořetězcovou strukturou**
- Stejně dlouhé molekuly o různé sekvenci vytvářejí rozdílné struktury a pohybují se různou rychlostí
- Lze dosáhnout **detekce rozdílů až jediného bp**

**Podobný efekt má gradient teploty**

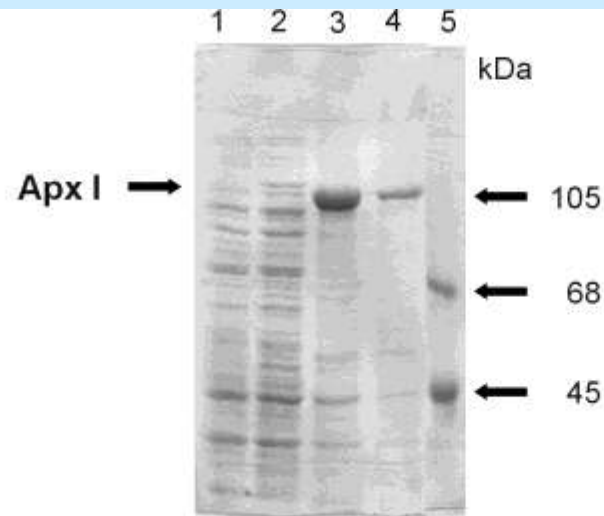
# ***Elektroforéza se uplatňuje při sekvenování nukleových kyselin***

- **desítky až stovky párů bazí**
- **denaturující polyakrylamidové gely (močovina)**
- **moderní metody využívají kapilární gelové elektroforézy**



# Existuje taky elektroforéza proteinů

- polyakrylamidové gely denaturující a nedenaturující
- různé způsoby detekce – Comassie brilliant blue, stříbro



**Fig. 1.** SDS-PAGE analysis of recombinant Apx I produced by *E. coli*. Lane 1: 20 ul aliquot of culture lysate before induction and 3 hours after IPTG induction (lane 2), lane 3: 20 ul aliquot of inclusion bodies from 3 hours cultured cells OD = 100 and OD = 20 (lane 4), lane 5: MW marker.

**Více si o elektroforéze  
proteinů řekneme ke konci  
semestru**



# ***Příklady využití elektroforézy***



**Jsou obsahem přednášky pro 5. ročník**

- **Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)**
- **Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)**
- **Polymorfismus délky fragmentů DNA vytvořených cleavázou (CFLP)**
- **Polymorfismus konformace jednořetězců (CSCP)**
- **Polymorfismus konformace dvouřetězců (DSCP)**



***A tak to někdy taky chodí ...***



***A tak to někdy taky chodí ...***



***A tak to někdy taky chodí ...***



***A tak to někdy taky chodí ...***



***A tak to někdy taky chodí ...***



***A tak to někdy taky chodí ...***



***A tak to někdy taky chodí ...***



# ***Shrnutí***

- 1) Elektroforéza – základní informace**
- 2) Typy elektroforéz**
- 3) Stanovení velikosti fragmentů elektroforézou**
- 4) Různé typy barvení gelů**
- 5) Pulsní gelová elektroforéza**
- 6) Denaturační elektroforéza**
- 7) Kapilární elektroforéza**

