

# Elektroforetické separační metody



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
  - 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

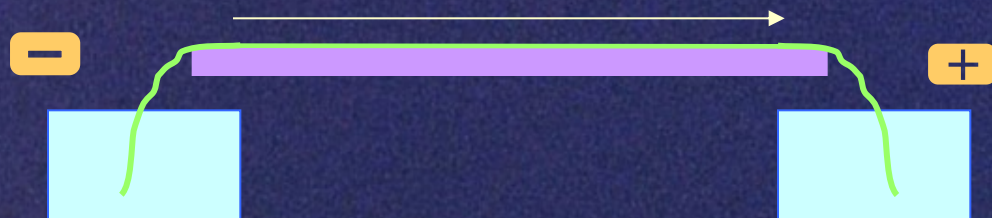


- Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny
  - agarózou
  - polyakrylamidem
- Vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry
- Velikost pórů lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru
- Optimální velikost separovaných molekul
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



# Uspořádání gelové elektroforézy

- Horizontální

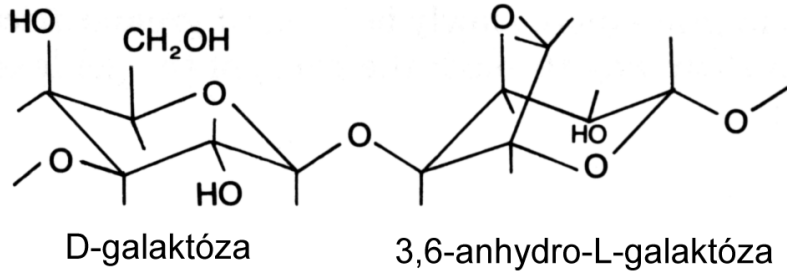


- Vertikální



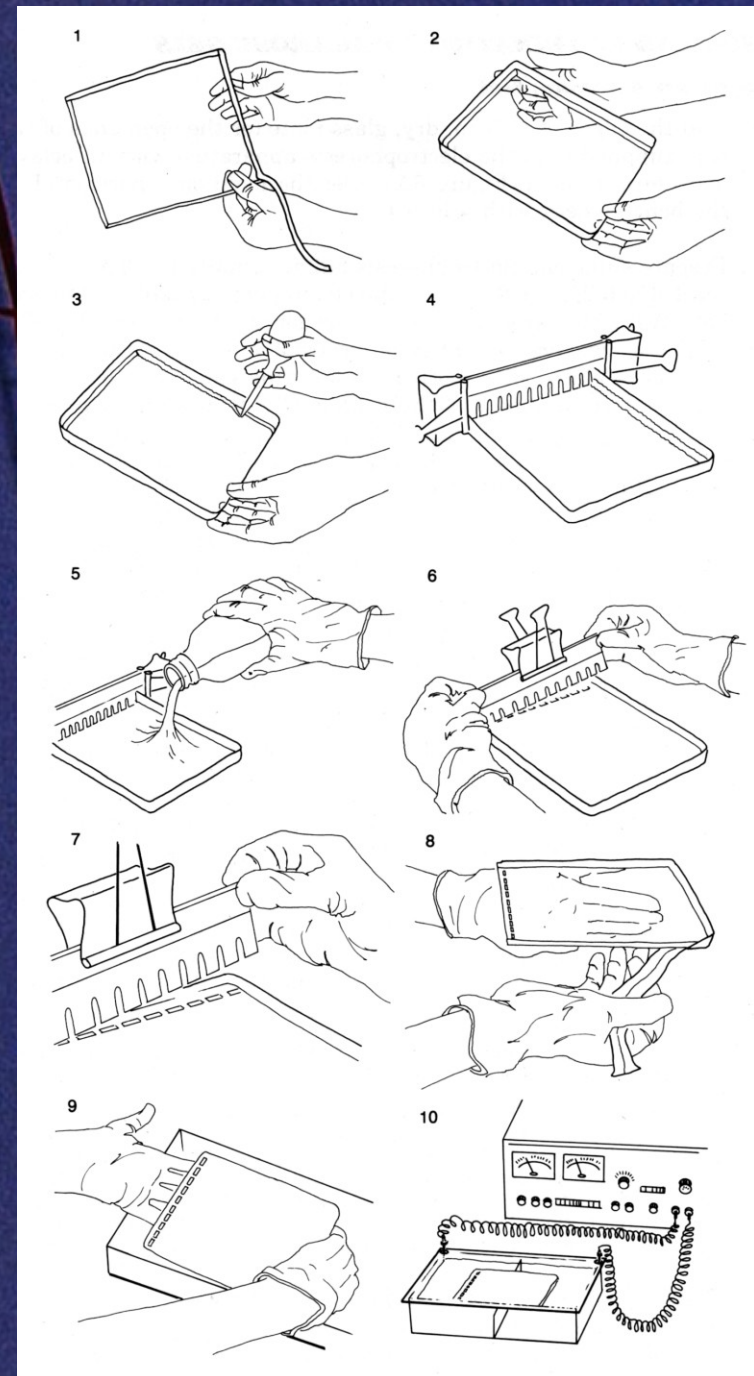
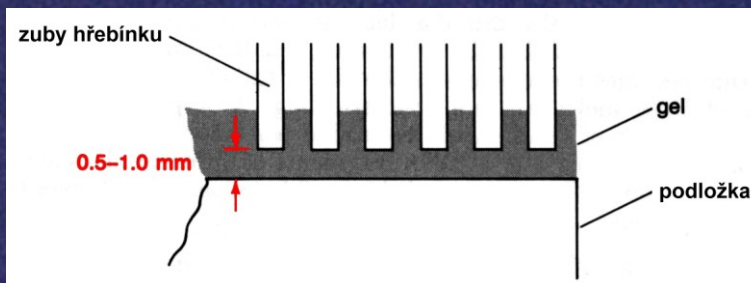


# Agarózové gely



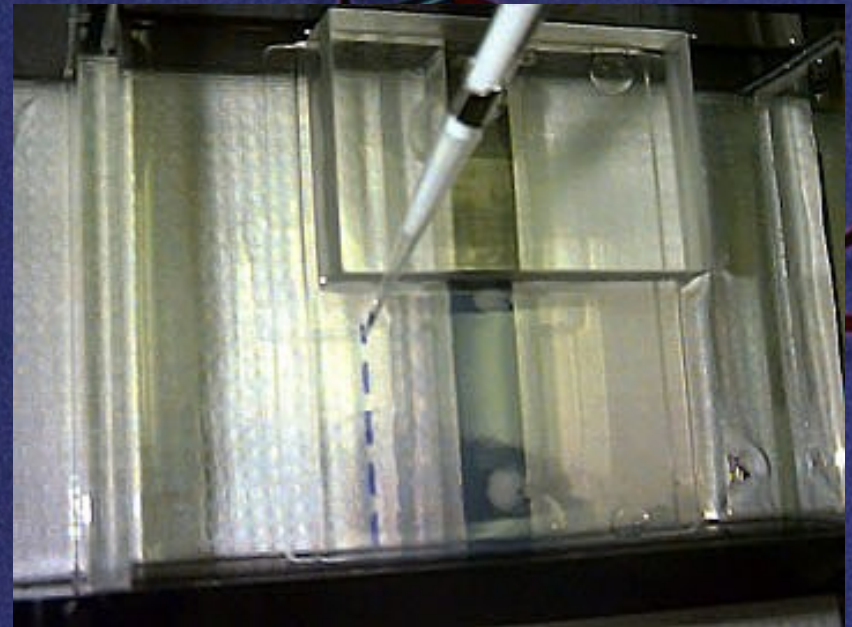
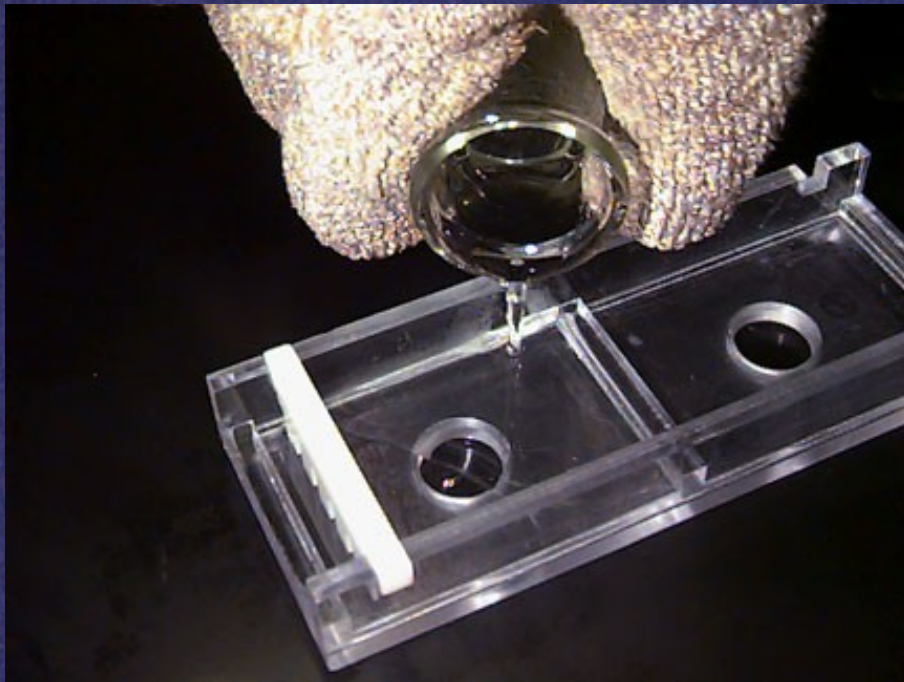
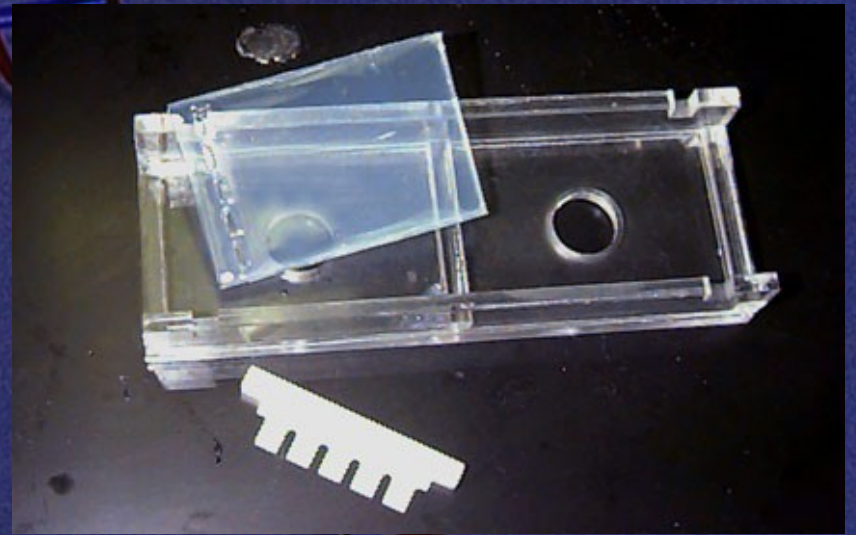
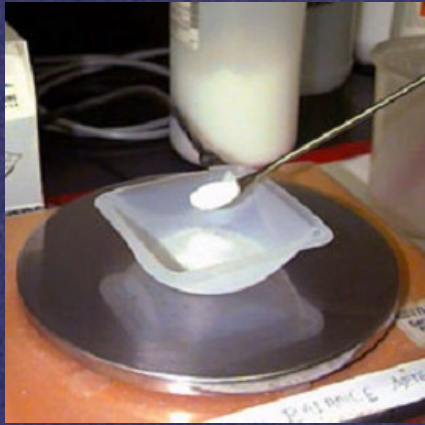
Separáčnı schopnosti gelu v závislosti na koncentraci agarózy

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





# Příprava agaróзовého gelu






# Aparatura pro horizontální elektroforézu





# Příprava polyakrylamidových gelů

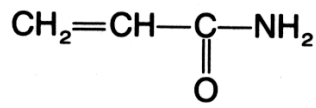
- Složení: kopolymer akrylamidu a N,N,- metylenbisakrylamidu
- Monomer je neurotoxin  a mutagen
- Katalyzátor – tetramethylethyldiamin (TEMED)
- Iniciátor – persíran amonný  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- Radikálová polymerace
- V důsledku přítomnosti bifunkčního agens N,N,- metylenbisakrylamidu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

## Separční schopnosti elektroforetických gelů v závislosti na koncentraci akrylamidu

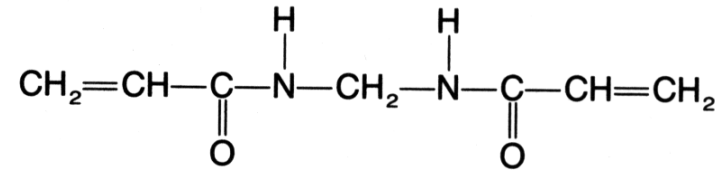
Koncentrace polyakrylamidu v gelu	Rozsah dělení dsDNA
3,5 %	1000 – 2000 bp
5,0 %	80 – 500 bp
8,0 %	60 – 400 bp
12,0 %	40 – 200 bp
15 %	25 – 150 bp
20 %	6 – 100 bp



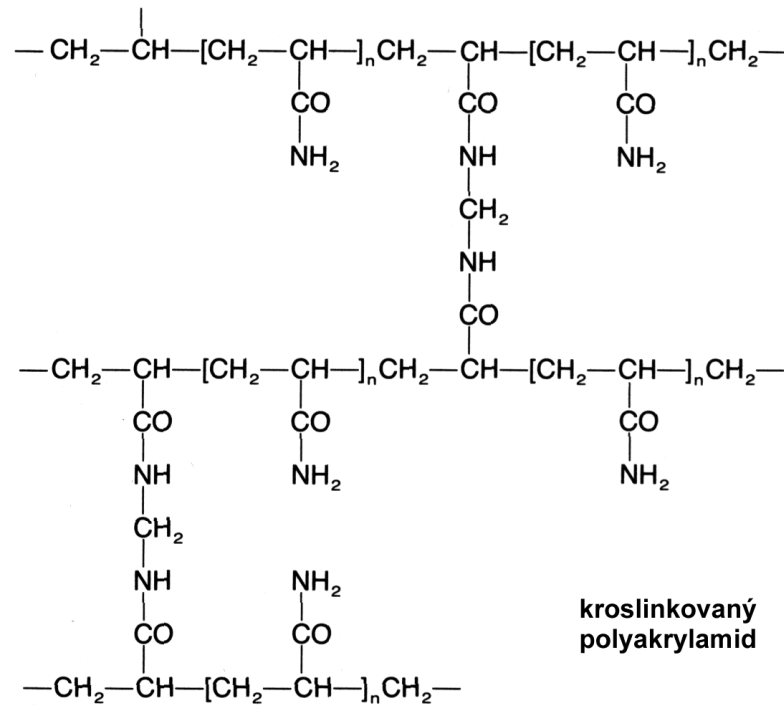
# Polyakrylamid



akrylamid



*N,N'*-metylenbisakrylamid

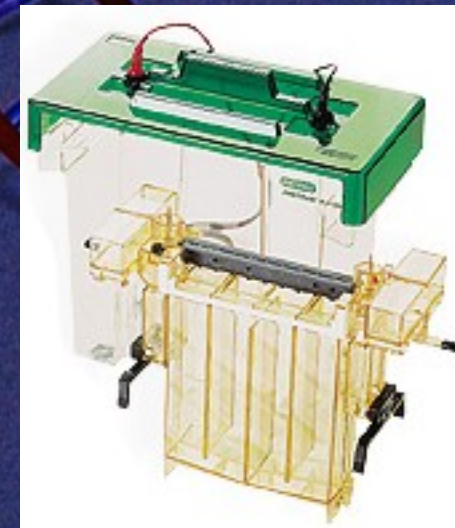
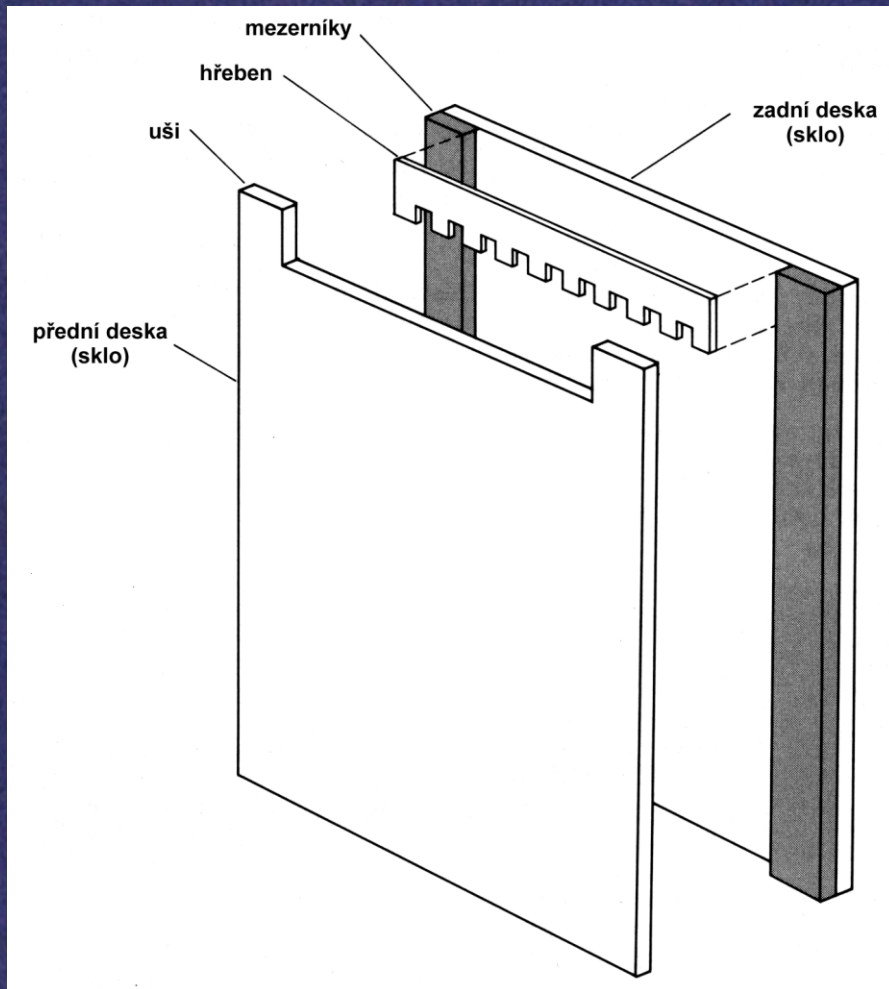


kroslinkovaný polyakrylamid



# Aparatura pro vertikální elektroforézu

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





# 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



# 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 pufků
  - Založené na sacharóze
  - Založené na glycerolu
  - Kombinované



# 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		

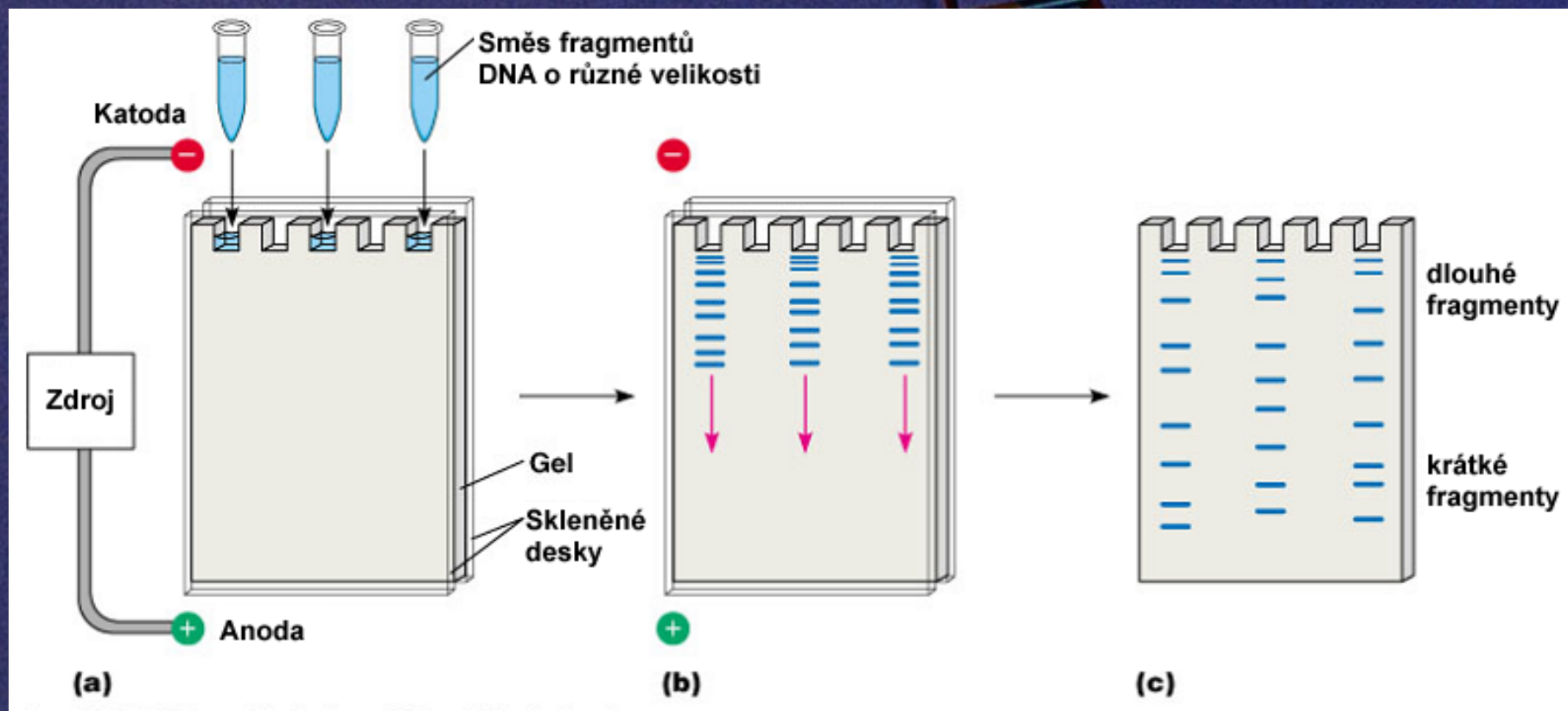


# Používané elektroforetické pufry

Pufr	Zkratka	Pracovní koncentrace	Zásobní koncentrace
Tris-acetátový	<b>TAE</b>	1 : 0,04 M Tris-acetát 1 mM EDTA	50
Tris-fosfátový	<b>TPE</b>	1 : 0,09 M Tris-fosfát 2 mM EDTA	10
Tris-borátový	<b>TBE</b>	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

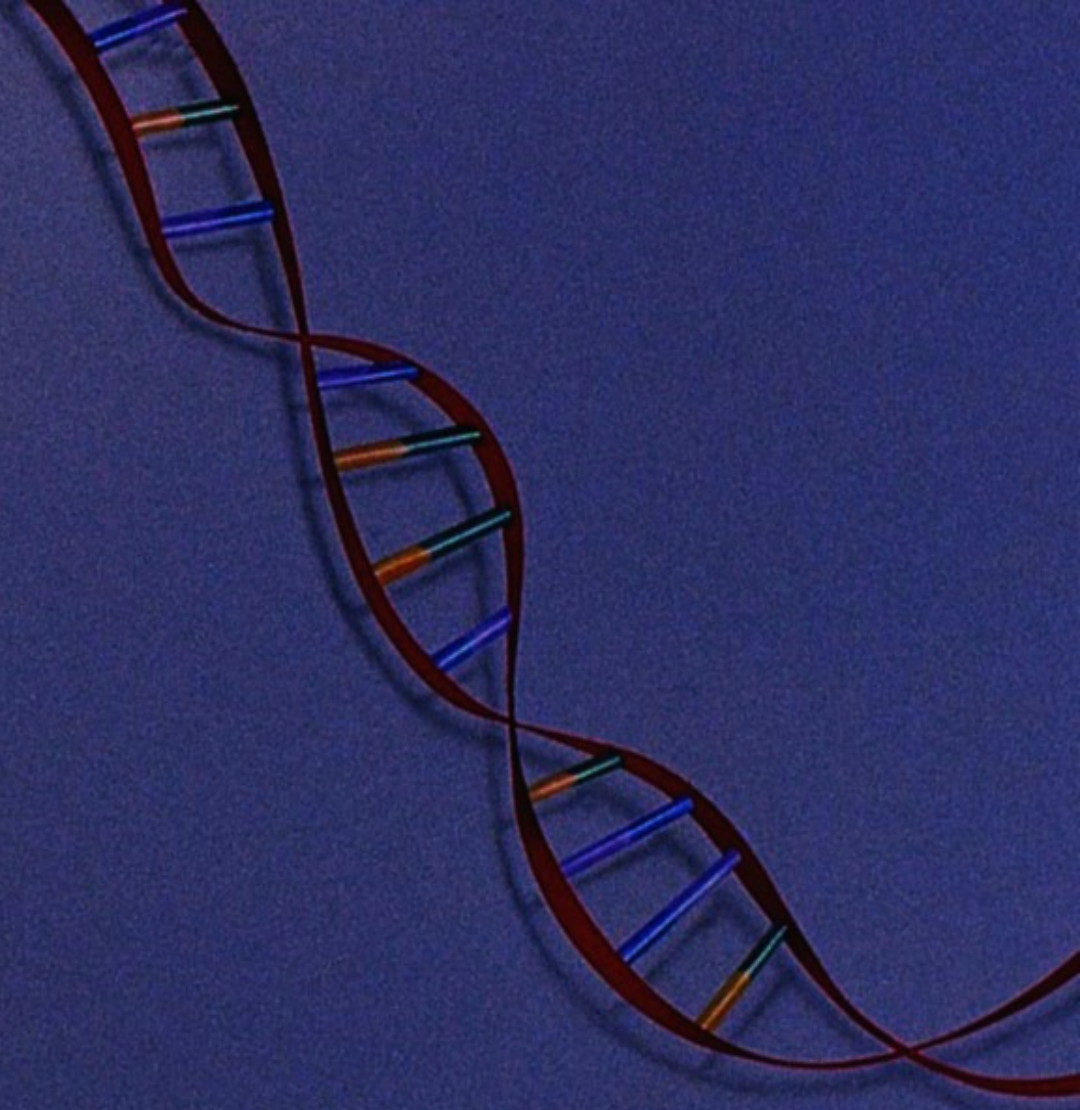


# Provedení elektroforézy





- [elfo.mov](#)

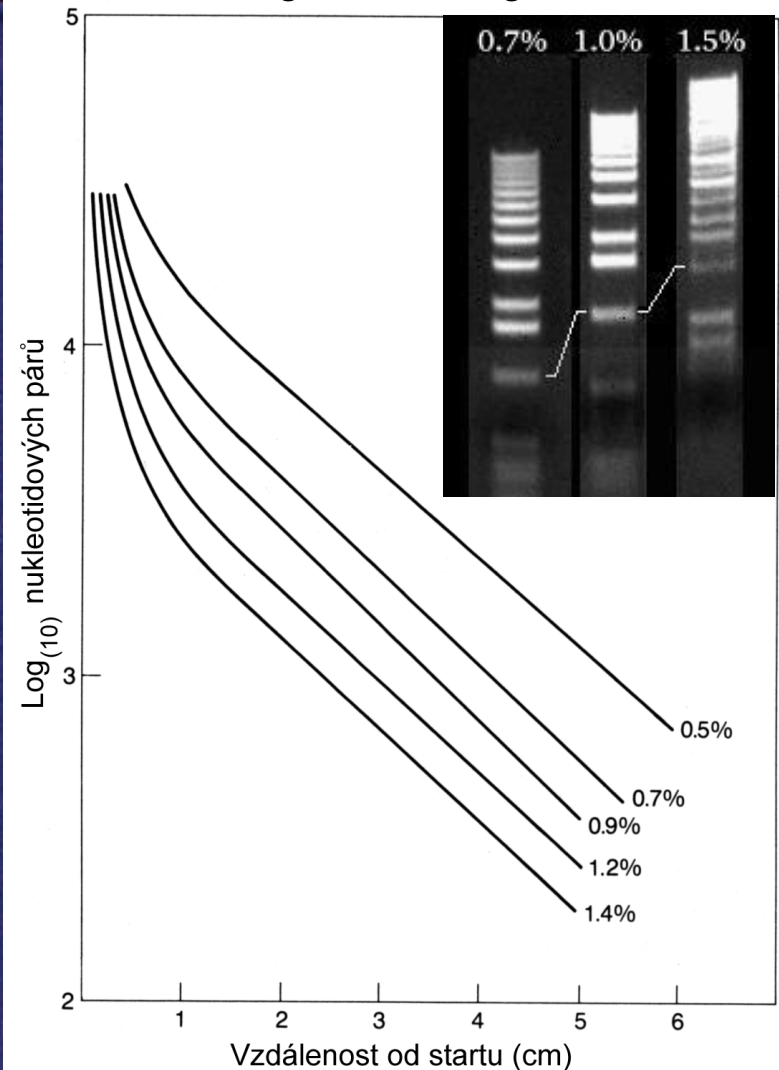




# Elektroforetická pohyblivost DNA

- 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, např. fága lambda.

Vztah mezi velikostí DNA a její elektroforetickou pohyblivostí v agarózovém gelu





# Metody detekce

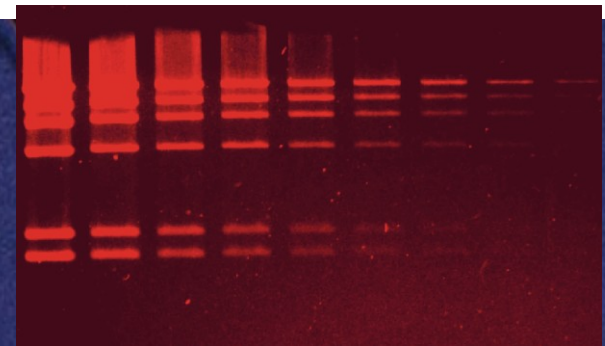
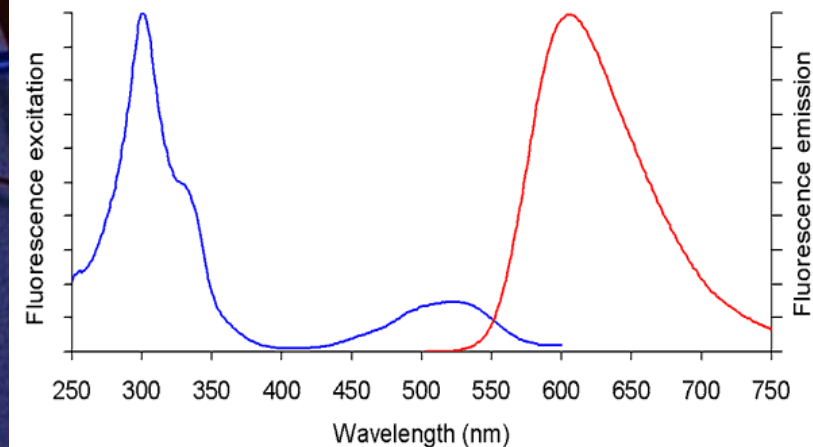


- Po proběhnutí elektroforézy je třeba identifikovat polohy rozdělených molekul, které nejsou pouhým okem viditelné.
- Molekuly DNA lze snadno zviditelnit
  - Přímým barvením vhodným barvivem
    - Nejjednodušší a nejlevnější
    - Barvivo se váže na DNA
    - Zbarvení je proporcionální koncentraci DNA 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  $^{32}\text{P}$  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

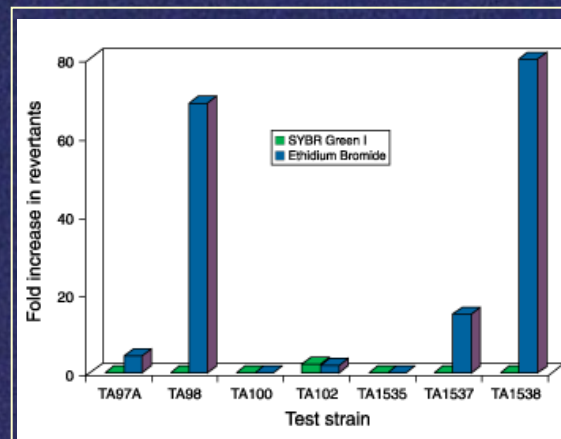
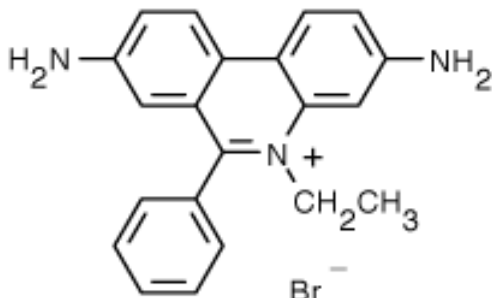


# Fenantridinová barviva – Etidium bromid

- 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 ~20 - 30 vyšší fluorescence
- Citlivost 1-5 ng DNA, 5 ng RNA (254 nm)
- Polyakrylamid zhasí fluorescenci EtBr, není možné detekovat méně jak 10 ng DNA



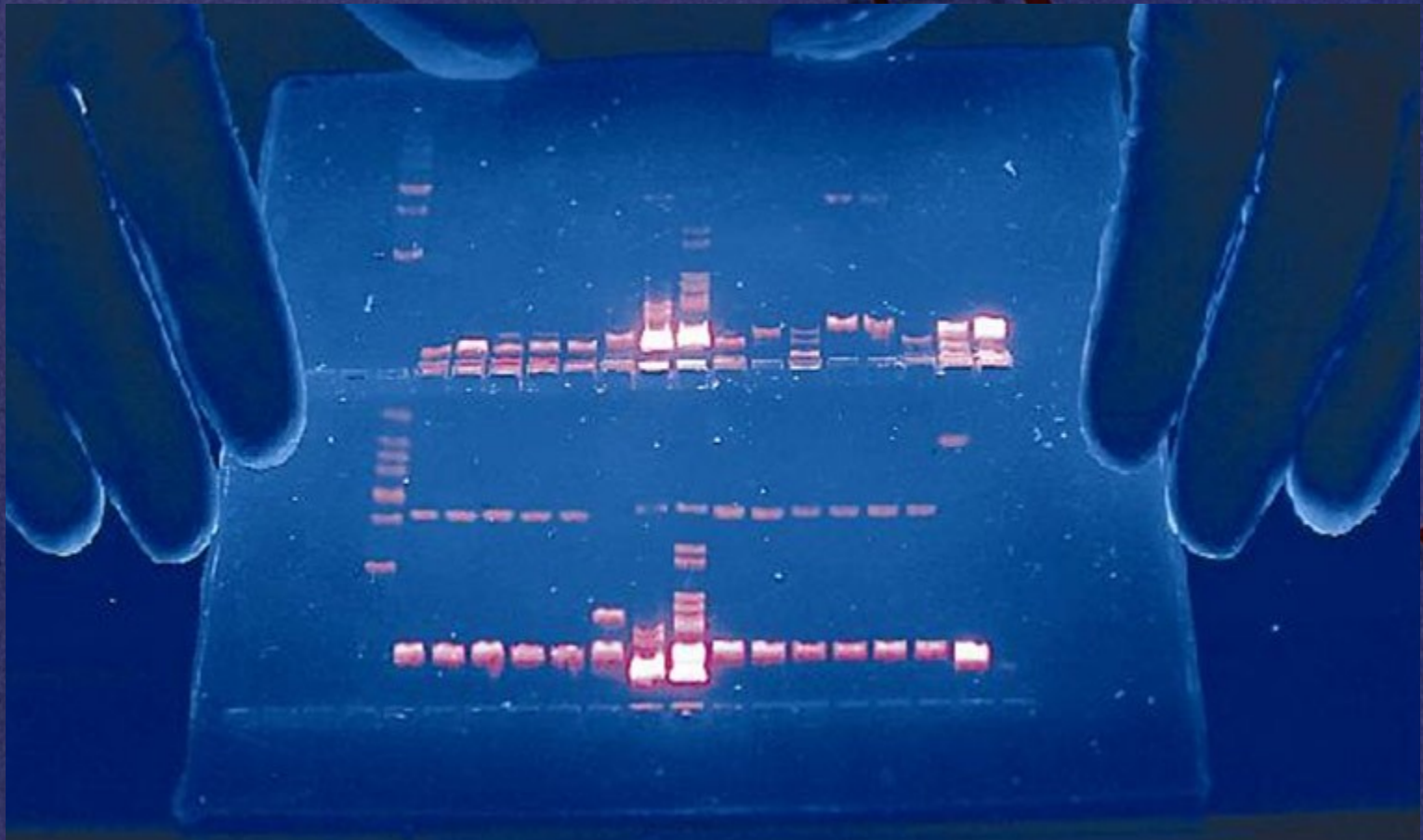
Etidium bromid (fenantridinium, 3,8-diamino-5-etyl-6-fenyl-bromid)



Srovnání výsledků  
Amesova testu  
u EtBr a SYBR



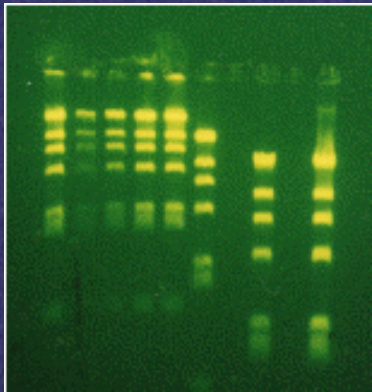
**Agarózový gel  
obarvený etidiumbromidem  
pozorovaný pod UV-světlem**



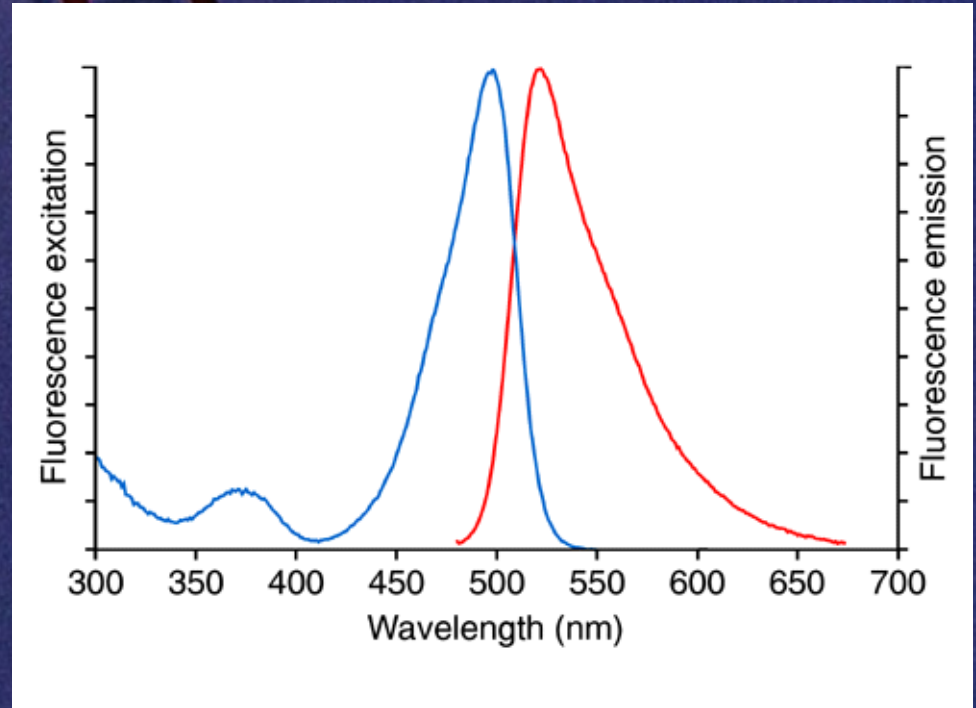
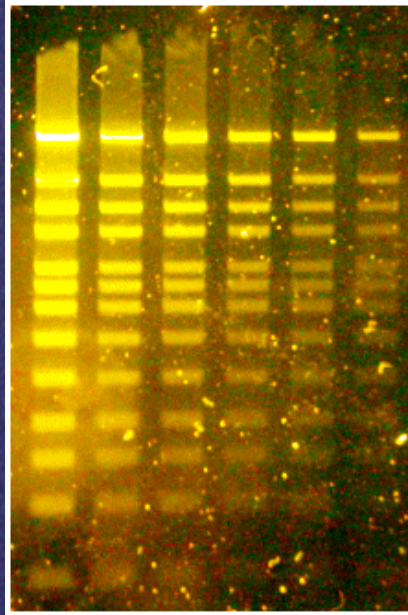


# Komerční kyaninová barviva - SYBR® Green a SYBR® Gold

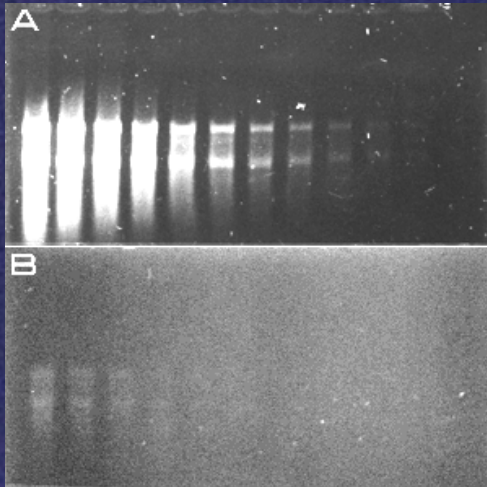
SYBR Green I



SYBR Gold



SYBR



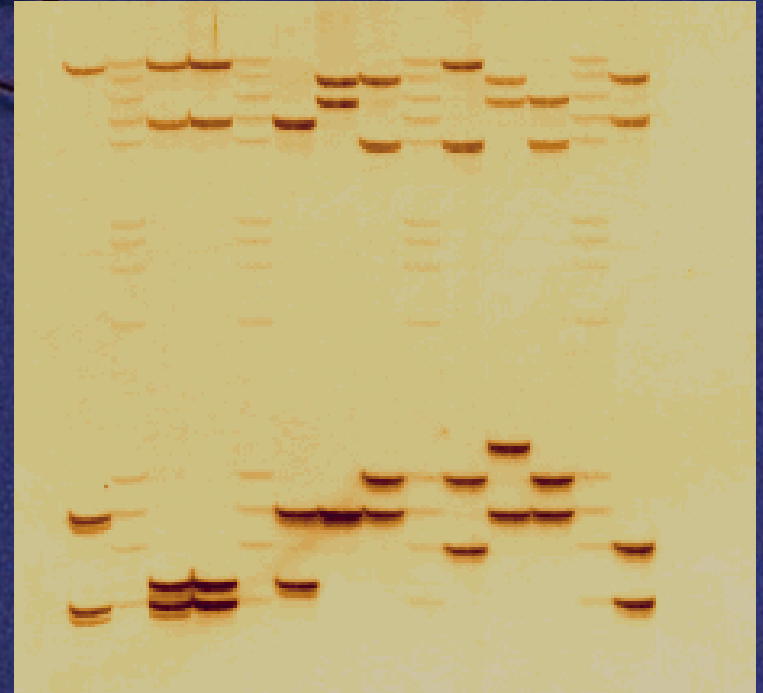
EtBr

- 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



# Barvení stříbrem

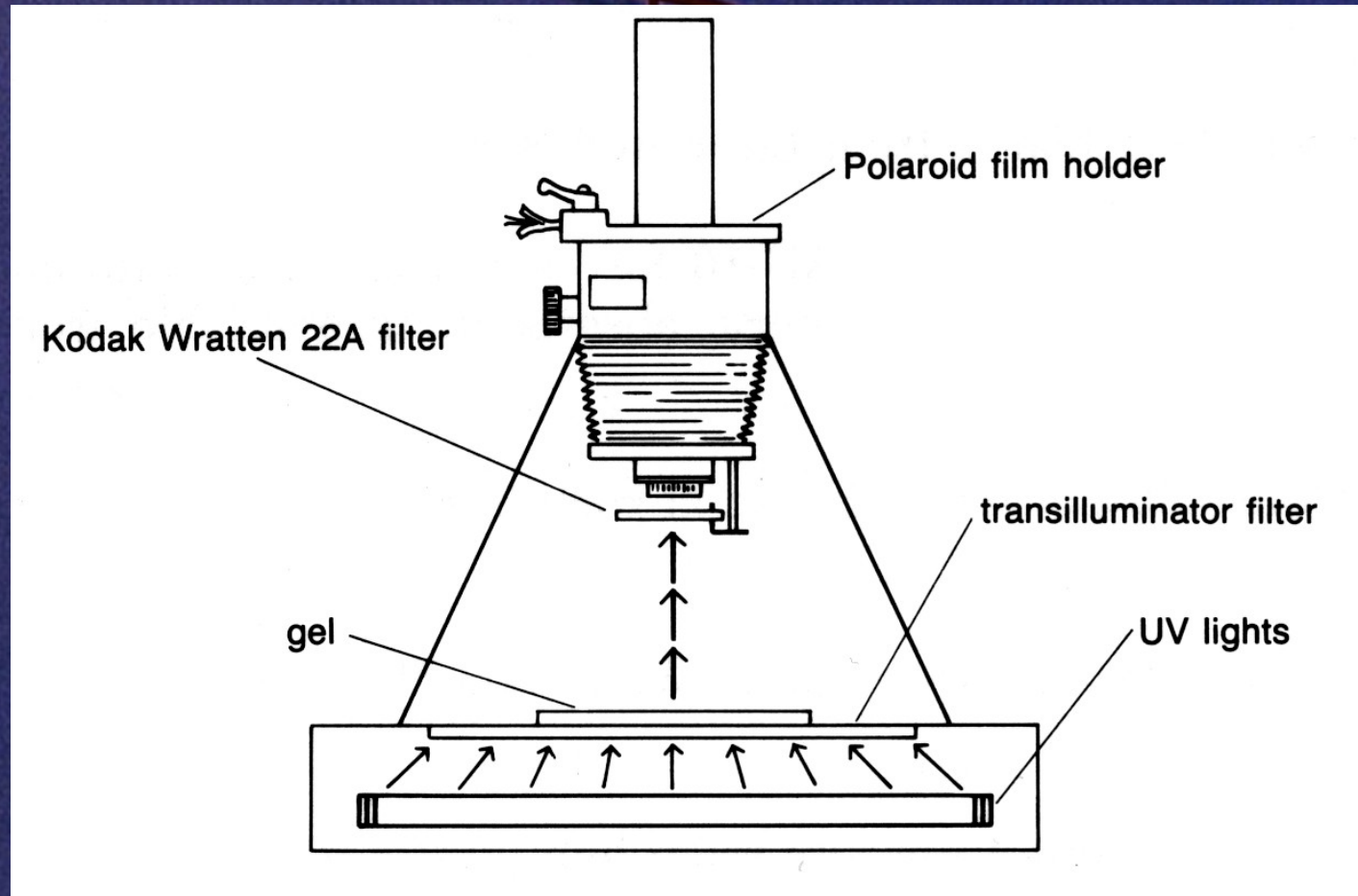
- Barvení NA stříbrem má mírně vyšší citlivost než barvením EtBr
- Citlivost 100 pg DNA v PA
- dsDNA, ssDNA i RNA
- Lepší citlivost vykazuje u polyakrylamidových gelů než u agarózových
- Barvení zahrnuje 3 kroky:
  - Fixace (metanol, ledová kyselina octová a glycerol)
  - Barvení (uhličitan sodný, dusičnan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





# Dokumentace

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





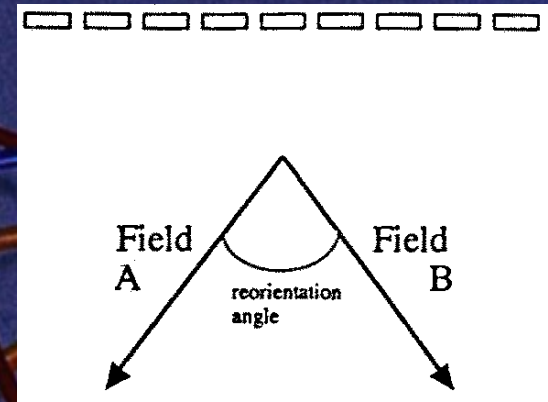
# Pulzní gelová elektroforéza

- 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 ) 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

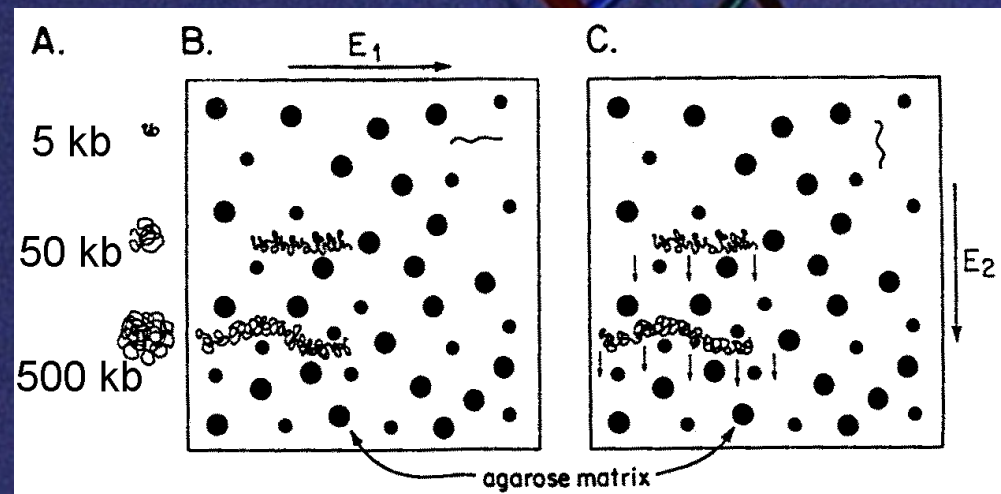
- **Pulzní pole** (pulsed field). Elektroforetický proces, který používá více než jedno elektrické pole, a ve kterém se elektrická pole střídavě aktivují.
- **Pulzní interval** (switch interval, switch time, pulse time). Čas, po který je každé ze střídajících se elektrických polí aktivováno.
- **Reorientační 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.





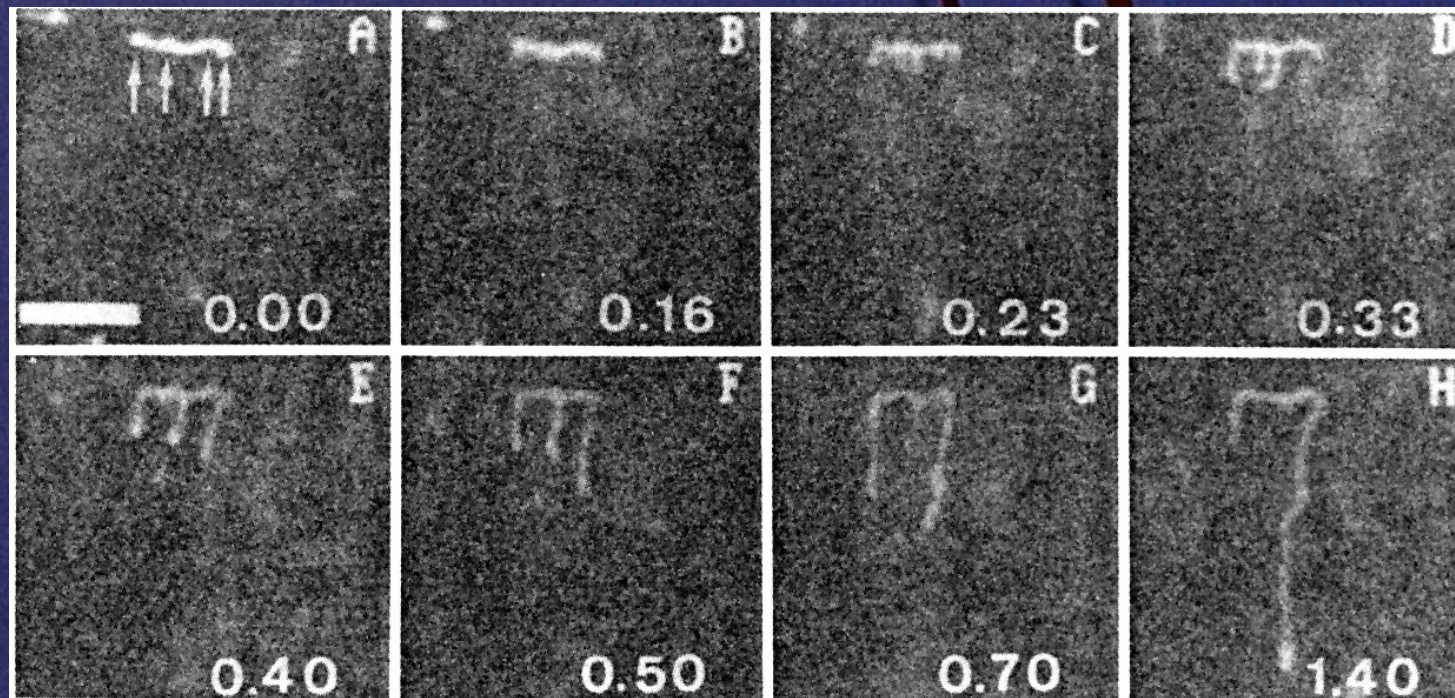
# Princip separace molekul v pulzním poli

- 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





# Používané standardy velikostí pro PFGE

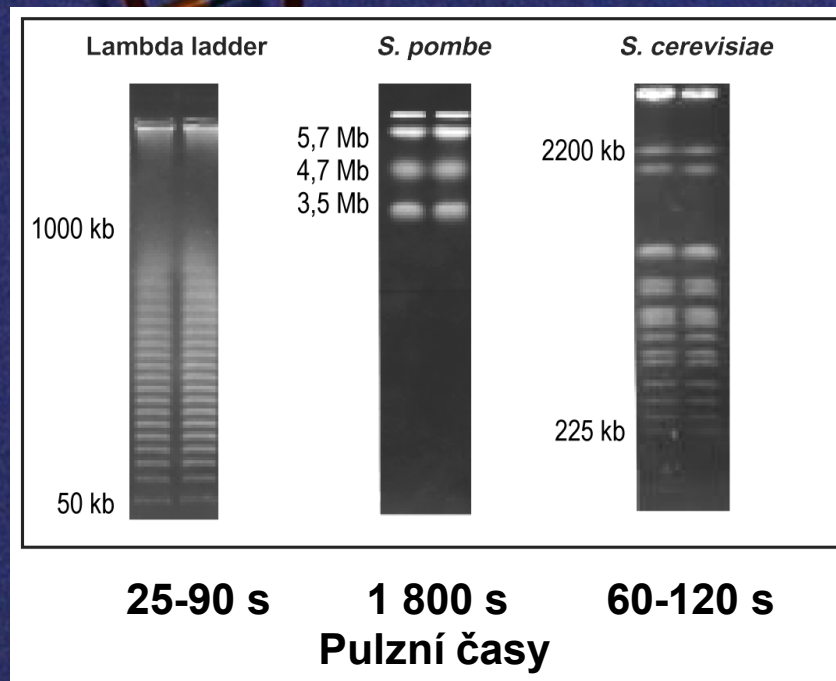
- Konkatemery plazmidů
- Konkatemery DNA fága lambda
  - Velikost monomeru 48,5 kb
- Makrorestrikční fragmenty bakteriálních genomů

- *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)

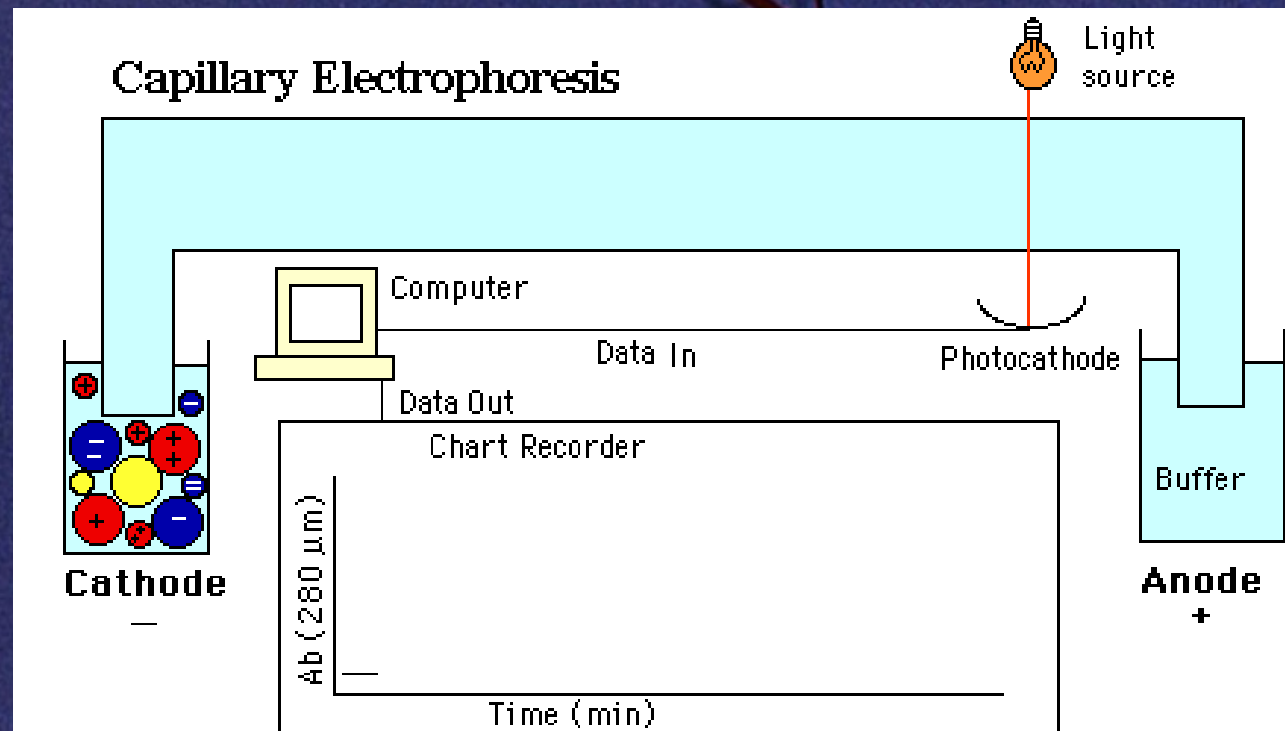




# Kapilární gelová elektroforéza

- **Kapilární gelová elektroforéza (CGE)** je proces umožňující elektroforetickou separaci nukleových kyselin na základě jejich velikosti.
- CGE relativně malých fragmentů DNA se provádí v povrchově modifikovaných křemenných kapilárách.
- Horní limit velikosti separovaných molekul je 50 kb.

• [CGE.AVI](#)

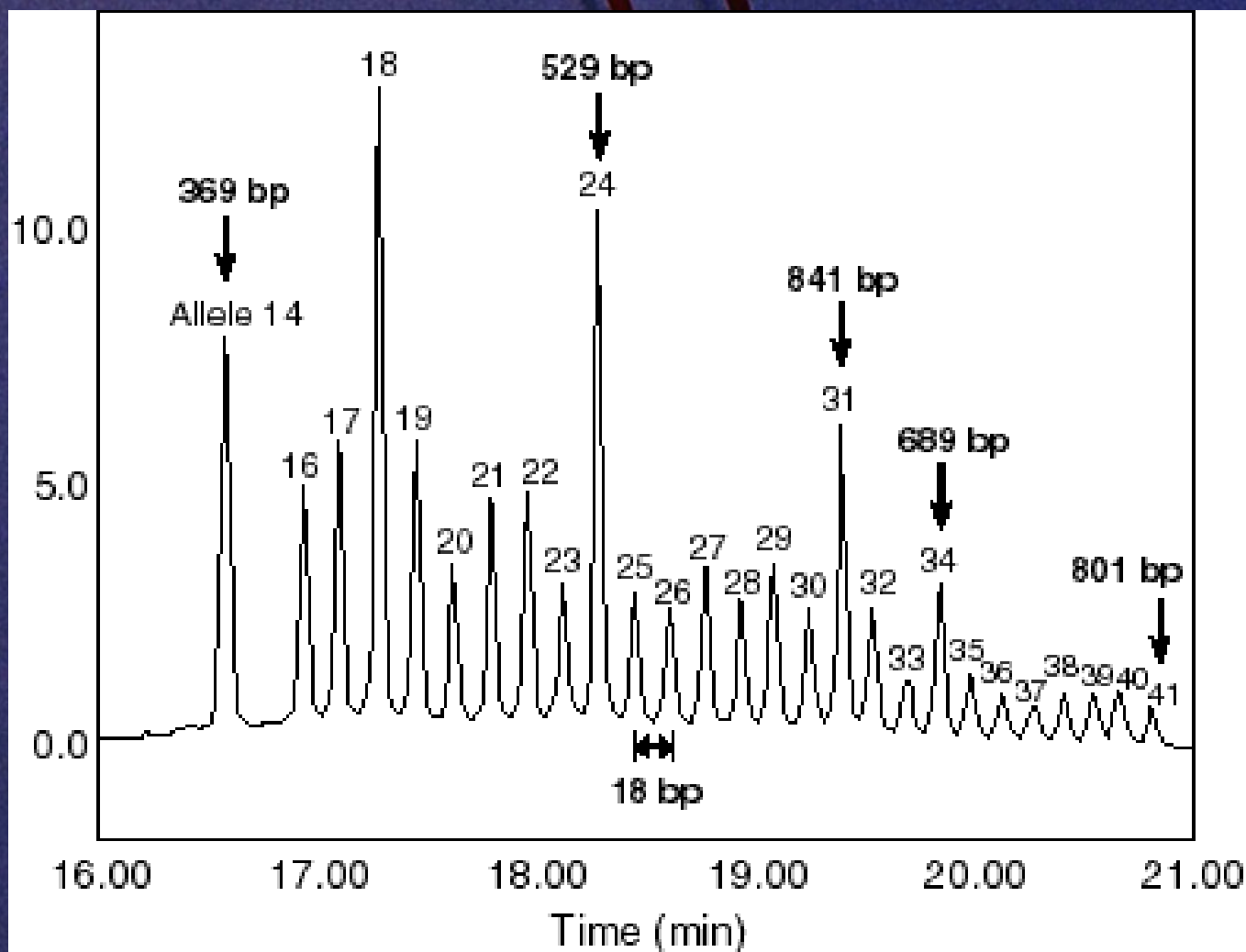




# Použití kapilární gelové elektroforézy

- Pro CGE jsou používány dva typy gelů:
  - relativně vysoce viskózní gely chemicky ukotvené na stěnu kapiláry (chemické gely)
  - roztoky polymerů s relativně nízkou viskozitou (fyzikální gely)
- CE má následující využití v diagnostice na úrovni nukleových kyselin:
  - **Kvalitativní a kvantitativní kontrola oligonukleotidů**
  - **Kvantifikace genové exprese**
  - **Detekce sond hybridizujících s DNA v kapiláře**
  - **Studium interakce DNA s proteiny**
  - **Genotypizace**
  - **Automatické sekvencování nukleových kyselin**





Příklad elektroforetogramu z kapilární elektroforézy