

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

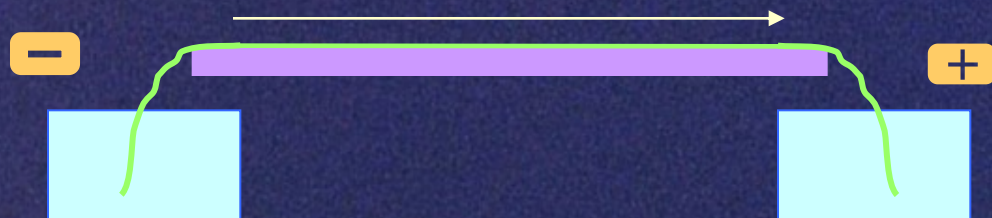
Používané nosiče



- 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

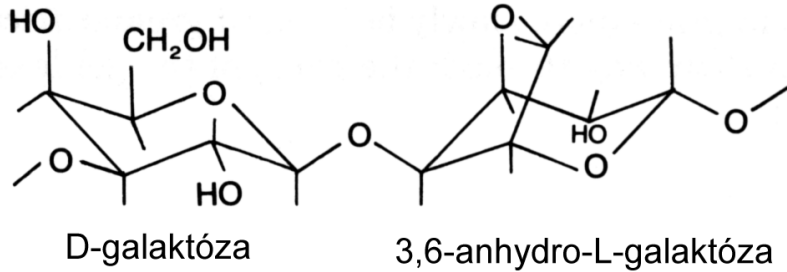
- Horizontální



- Vertikální

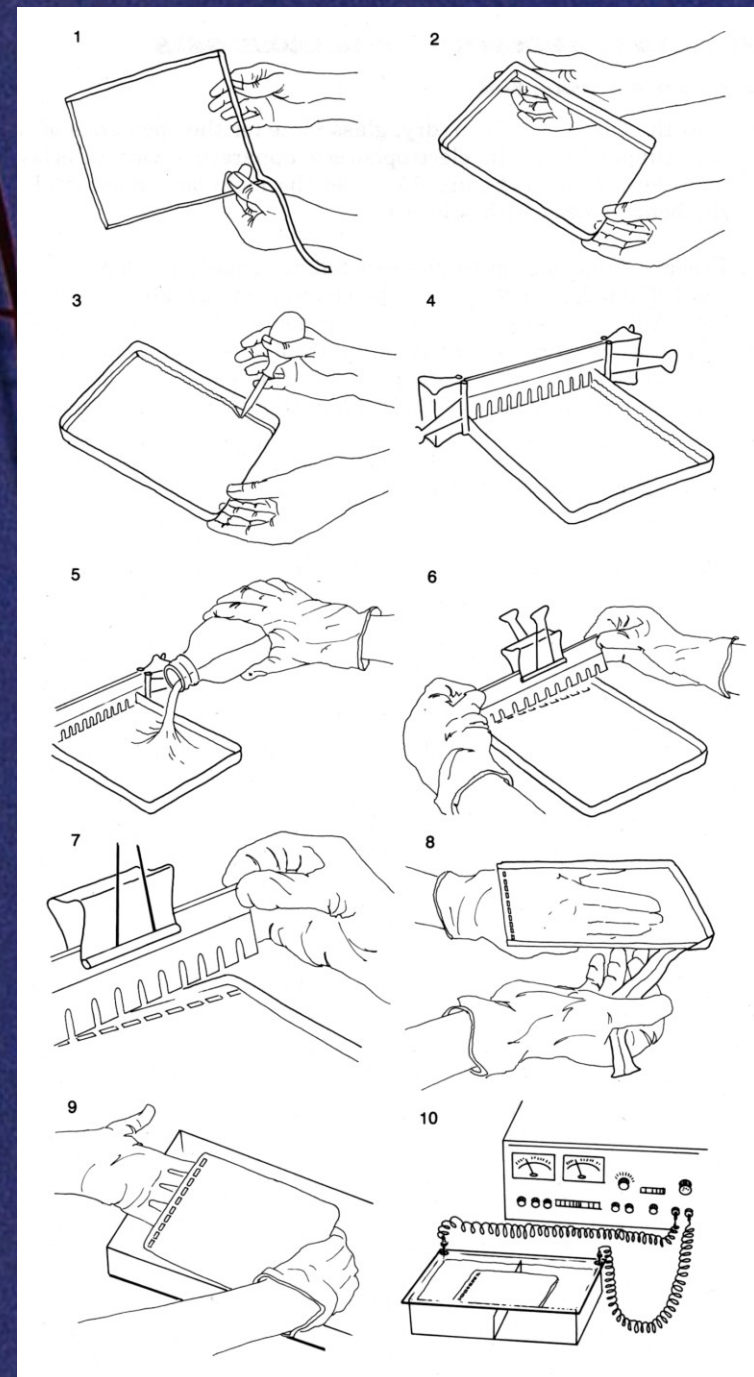
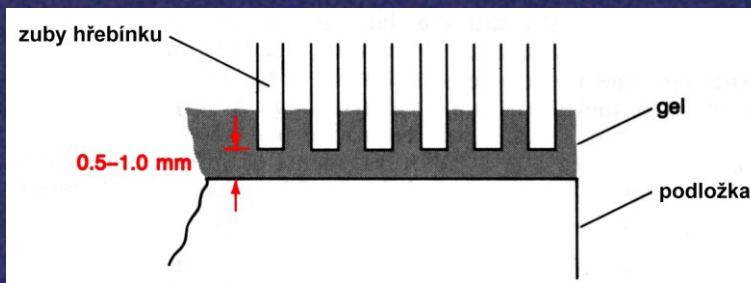


Agarózové gely

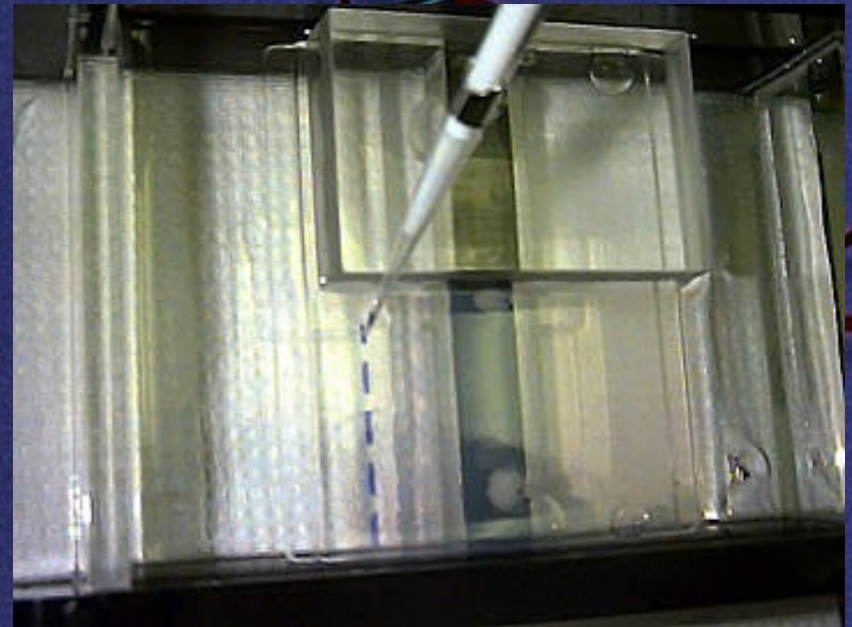
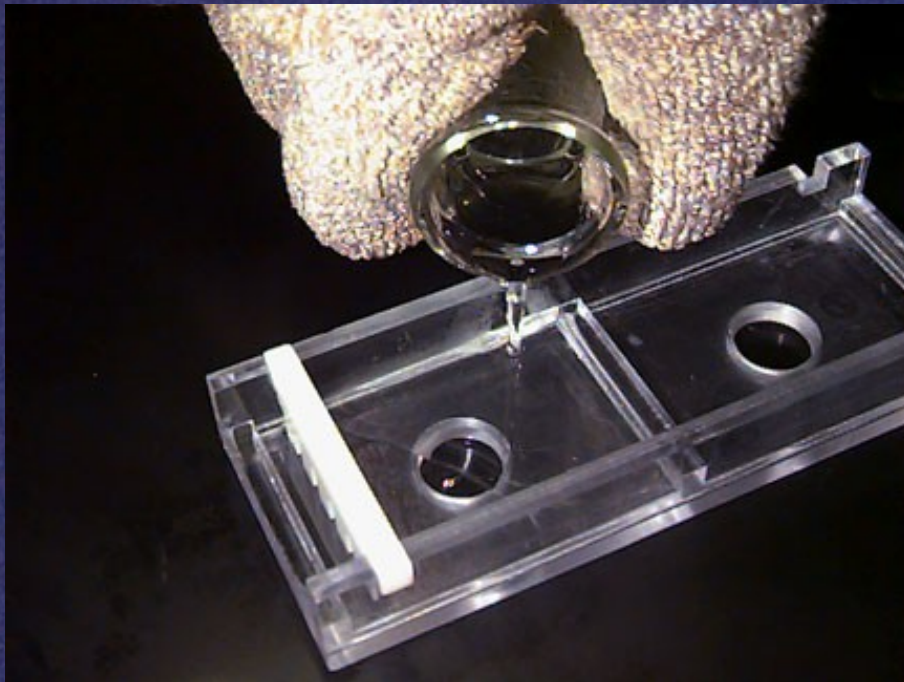
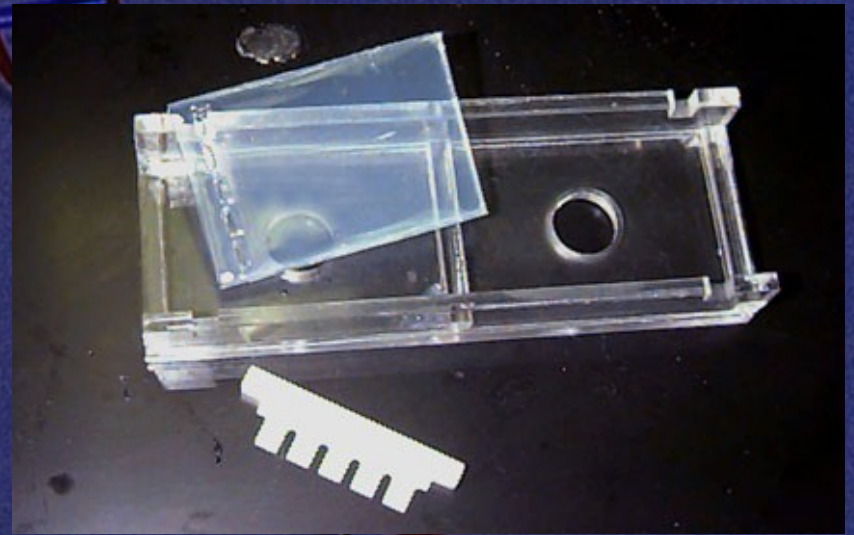
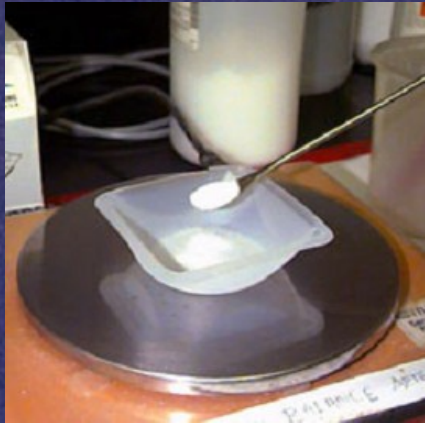


Separáčnı schopnosti gelu v závislosti na koncentraci agarózy

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



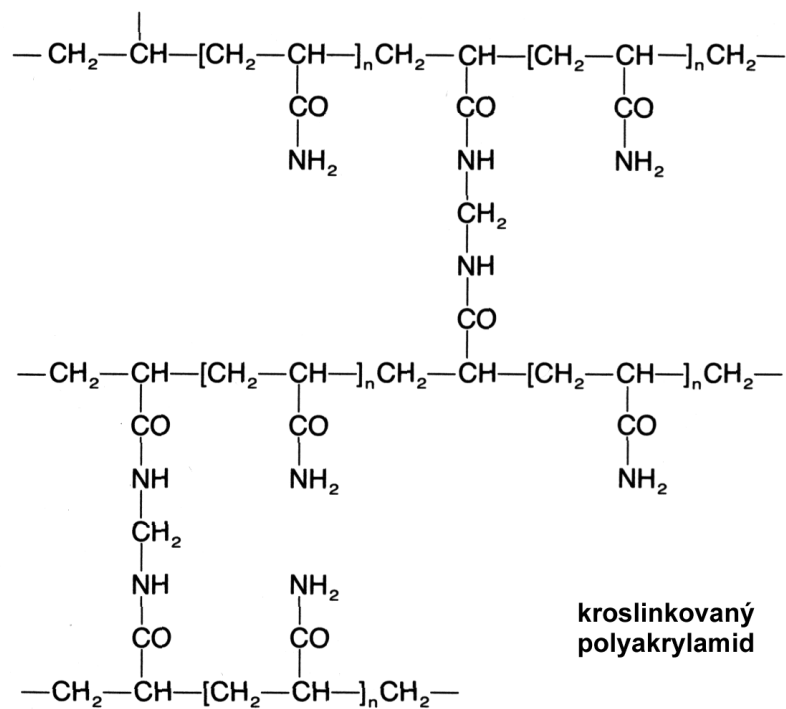
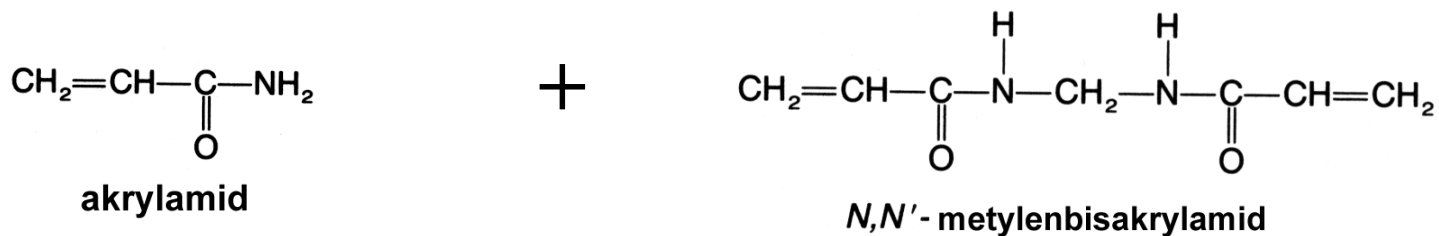
Příprava polyakrylamidových gelů

- Složení: kopolymer akrylamidu a N,N,- metylenbisakrylamidu
- Monomer je neurotoxin  a mutagen
- Katalyzátor – tetramethylethylendiamin (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

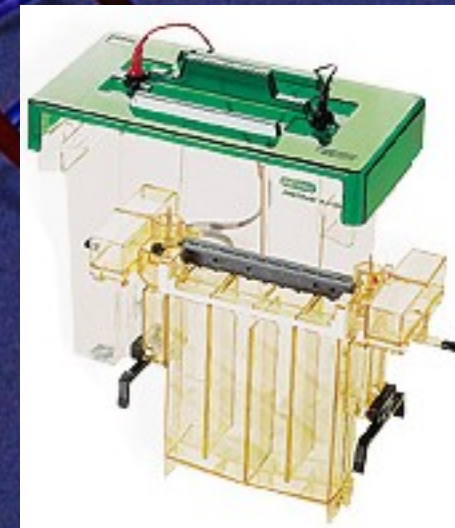
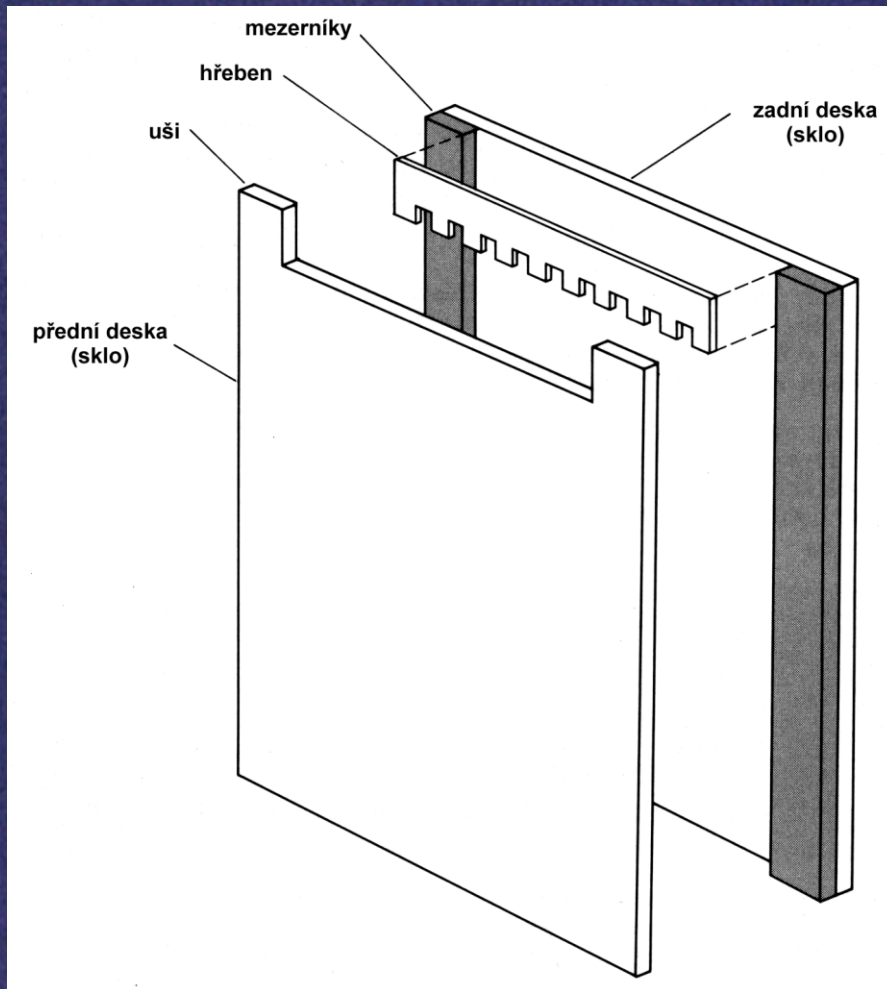
Koncentrace polyakrylamidu v gelu	Rozsah dělení dsDNA
3,5 %	1000 – 2000 bp
5,0 %	80 – 500 bp
8,0 %	60 – 400 bp
12,0 %	40 – 200 bp
15 %	25 – 150 bp
20 %	6 – 100 bp

Polyakrylamid



Aparatura pro vertikální elektroforézu

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

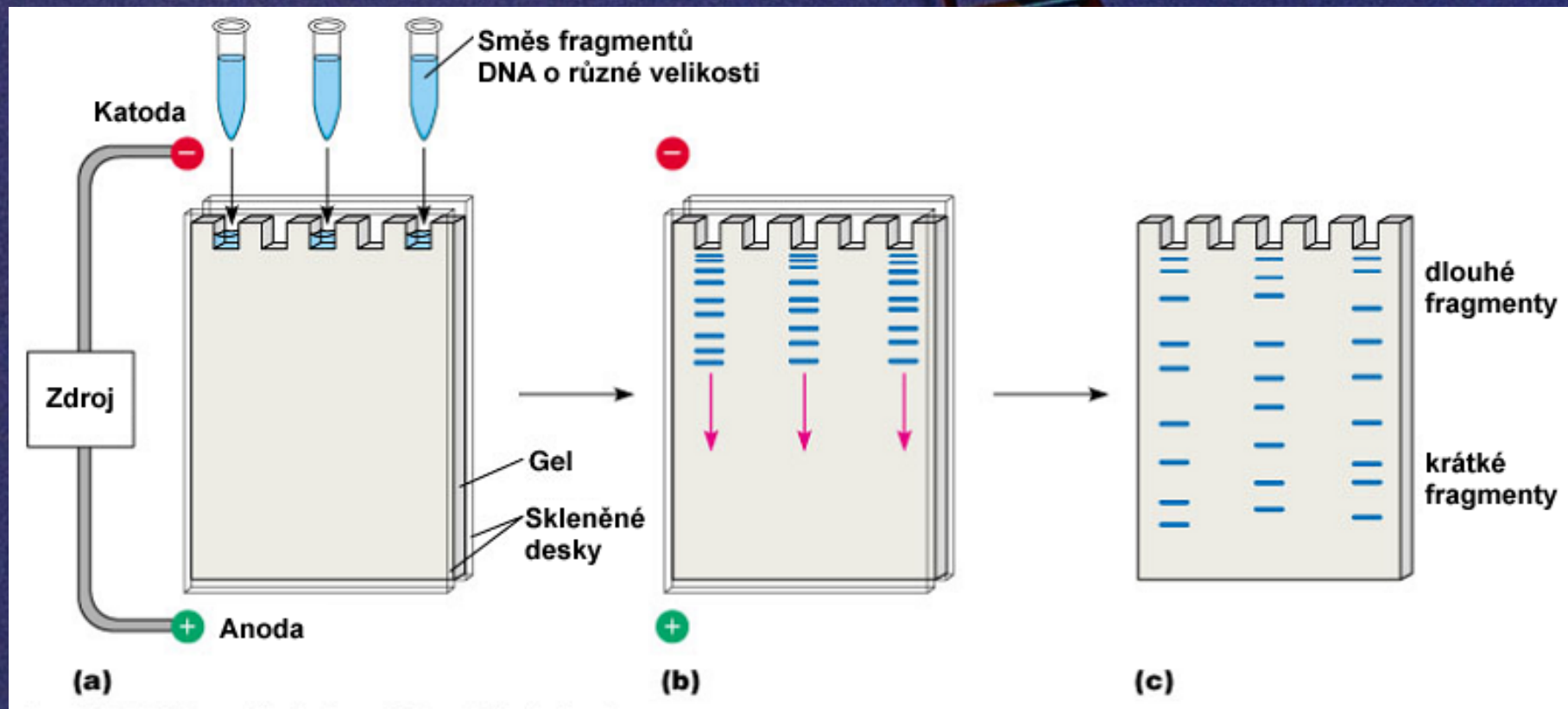


Pufry pro nanášení vzorků



- 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

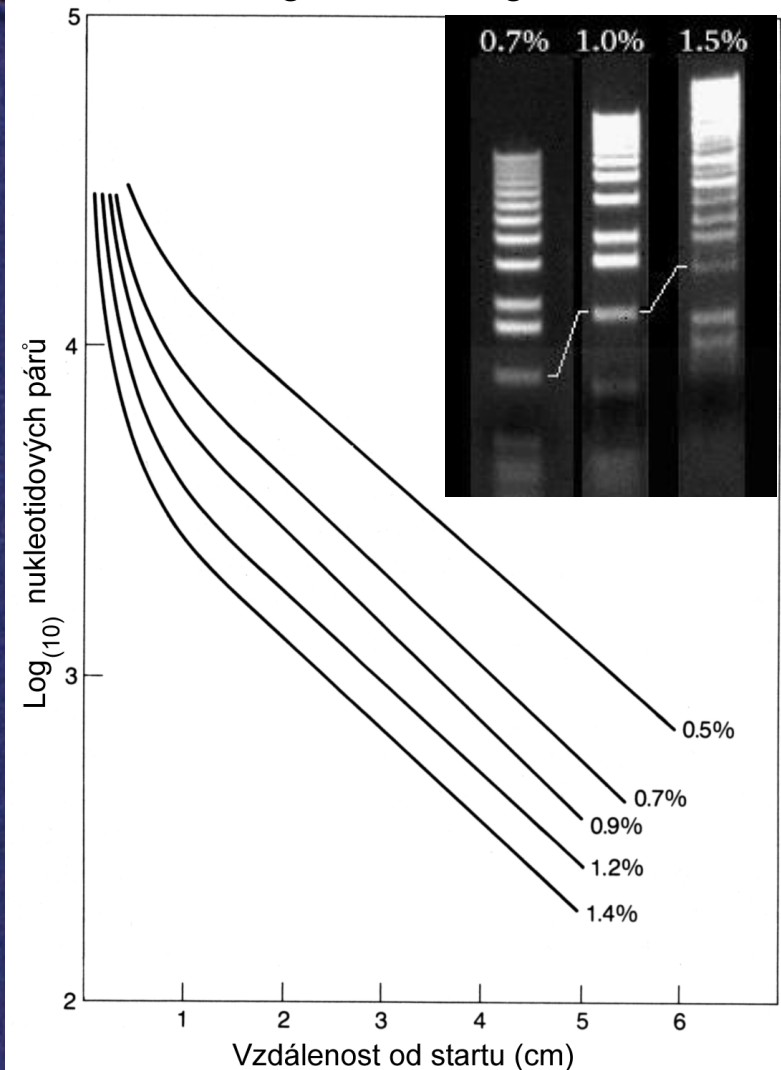
Provedení elektroforézy



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



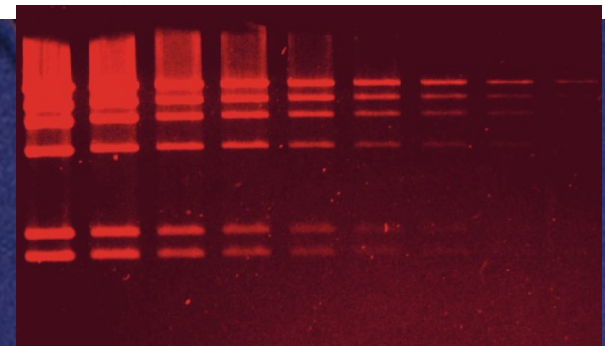
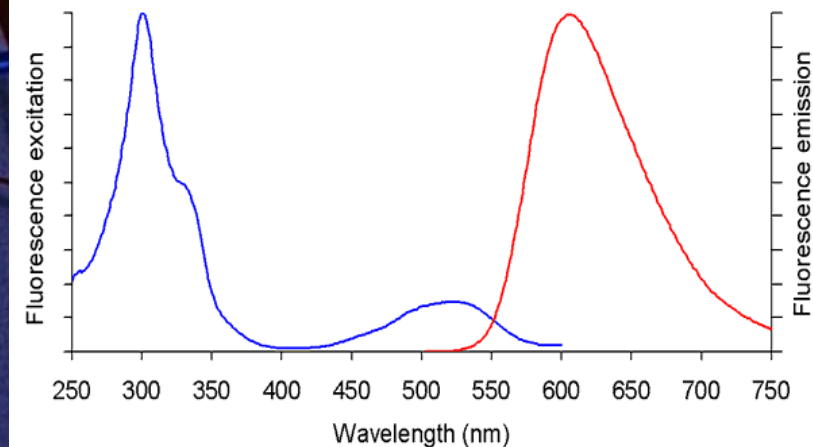
Metody detekce



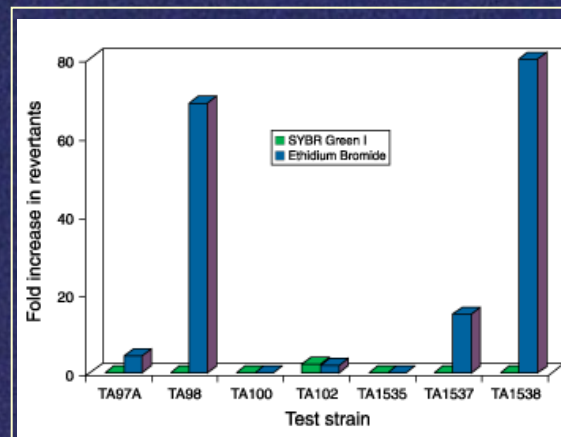
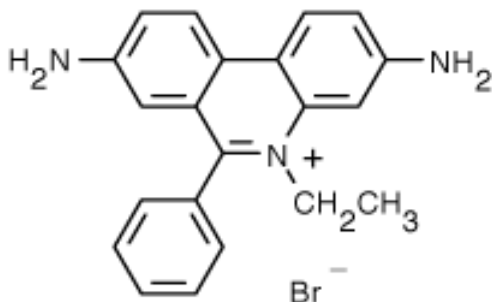
- Po proběhnutí elektroforézy je třeba identifikovat polohy rozdělených molekul, které nejsou pouhým okem viditelné.
- Molekuly DNA lze snadno zviditelnit
 - Přímým barvením vhodným barvivem
 - Nejjednodušší a nejlevnější
 - Barvivo se váže na DNA
 - Zbarvení je proporcionální koncentraci DNA a tím i 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 naneseo 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

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

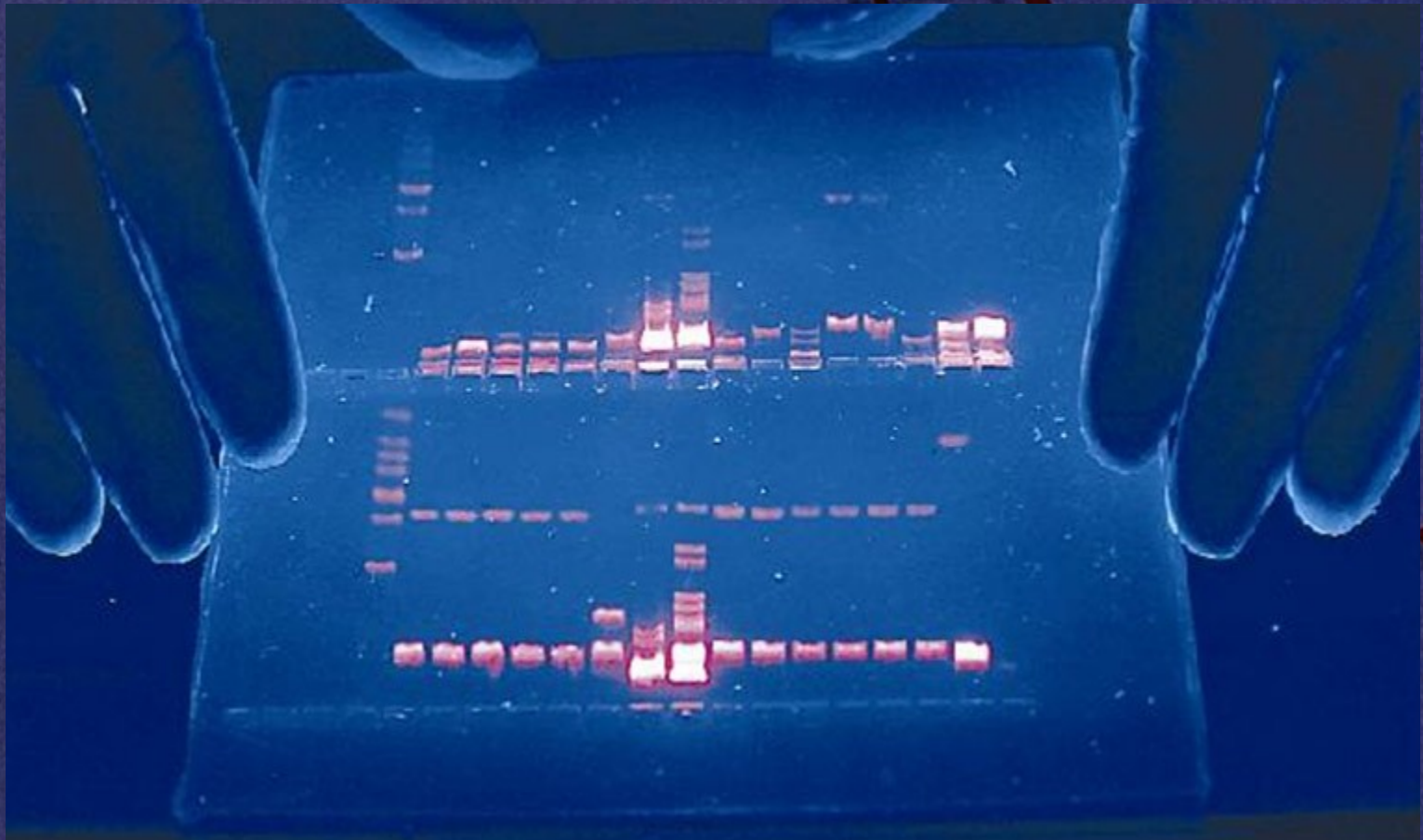


Etidium bromid (fenantridinium, 3,8-diamino-5-etyl-6-fenyl-bromid)



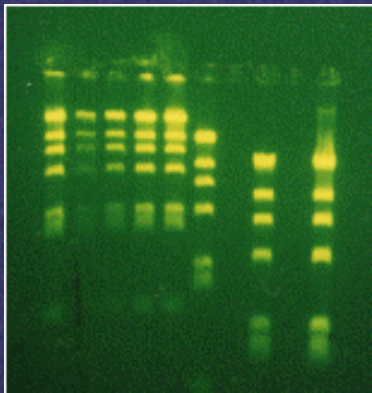
Srovnání výsledků
Amesova testu
u EtBr a SYBR

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

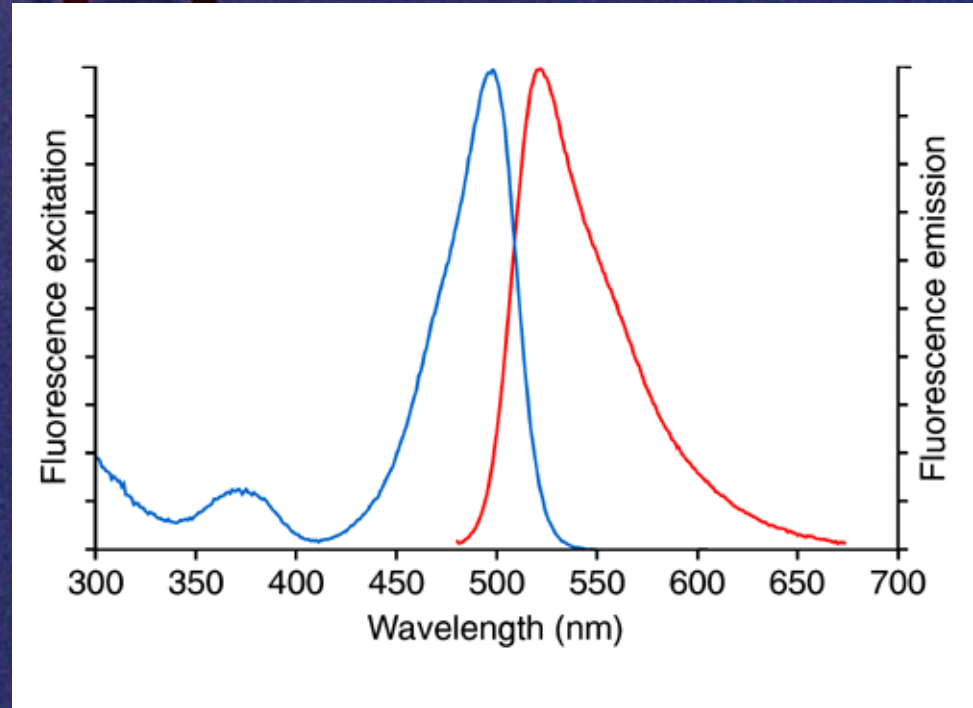
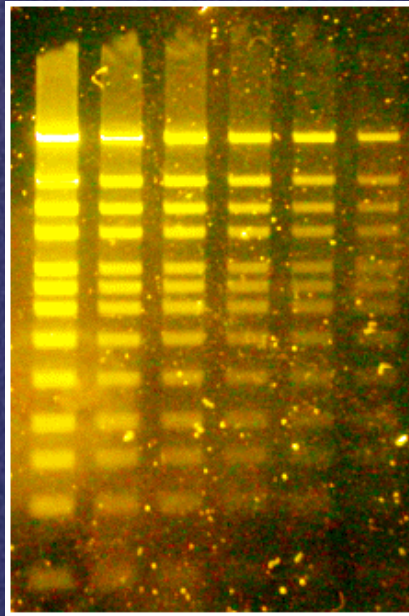


Komerční kyaninová barviva - SYBR® Green a SYBR® Gold

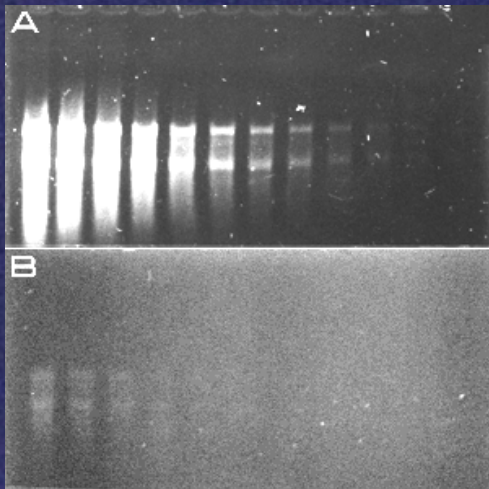
SYBR Green I



SYBR Gold



SYBR

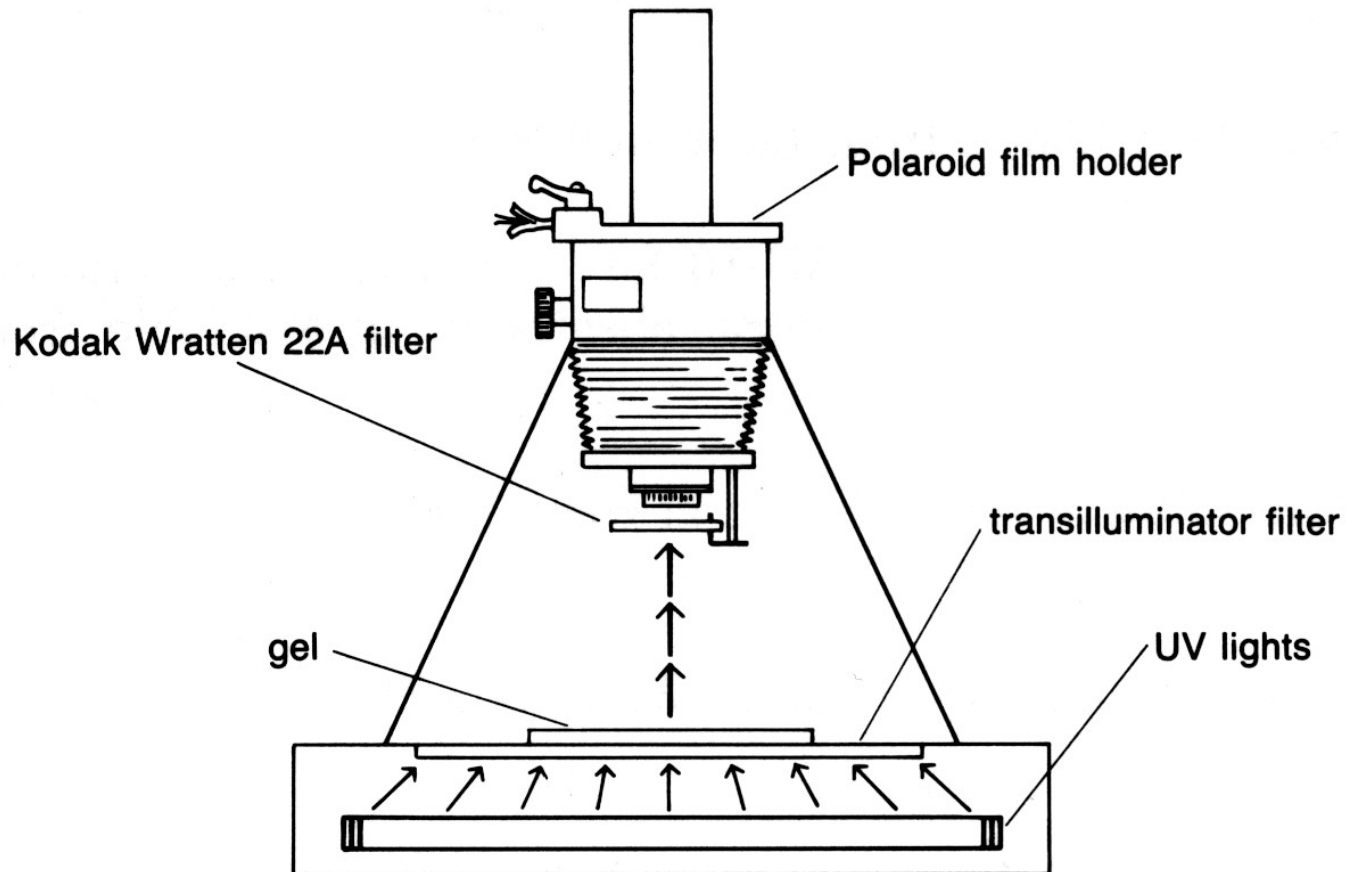


EtBr

- vysoká afinita k NA
- 1000x vyšší fluorescence po vazbě na NA
- 25 – 100x 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

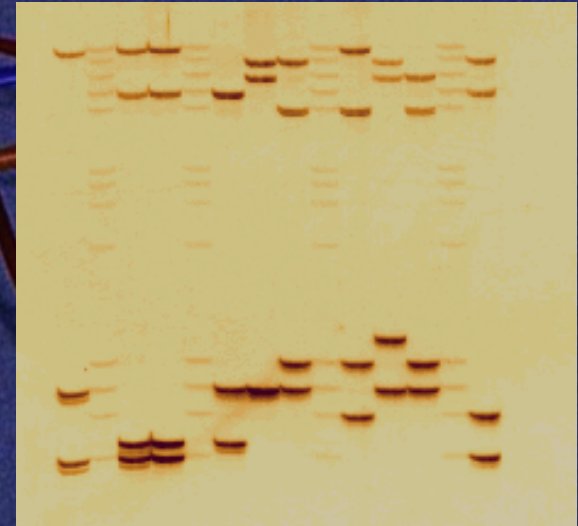
Dokumentace

- Etidiumbromid a SYBR Green vyžadují detekci pod UV-světlem
- Používané vlnové délky:
 - 254 nm
 - 302 nm
 - 365 nm



Barvení stříbrem

- Polyakrylamidové gely zháší fluorescenci, proto se barví stříbrem
- Barvení stříbrem má mírně vyšší citlivost než barvením EtBr
- Citlivost 100 pg DNA v PA
- dsDNA, ssDNA i RNA
- 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)

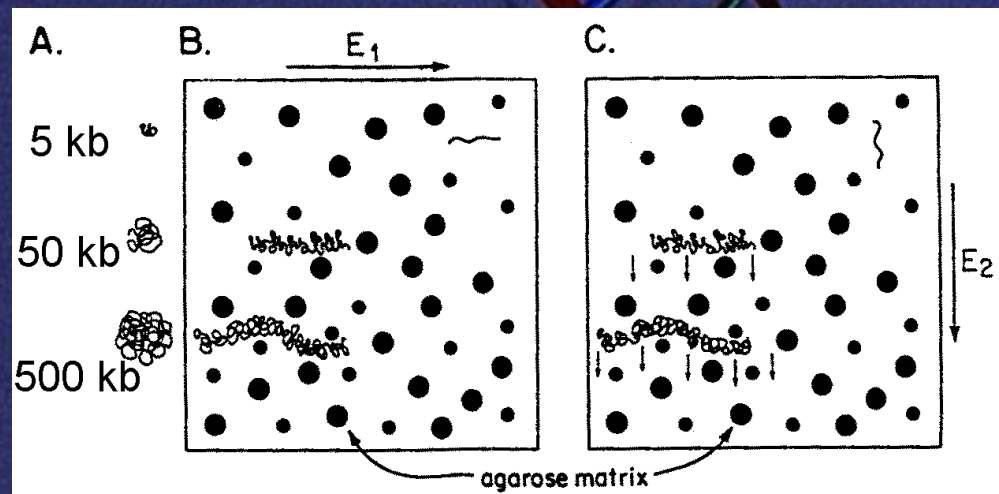


Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

- Při konvenční gelové elektroforéze je 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 separaci velkých molekul 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.

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.



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.

