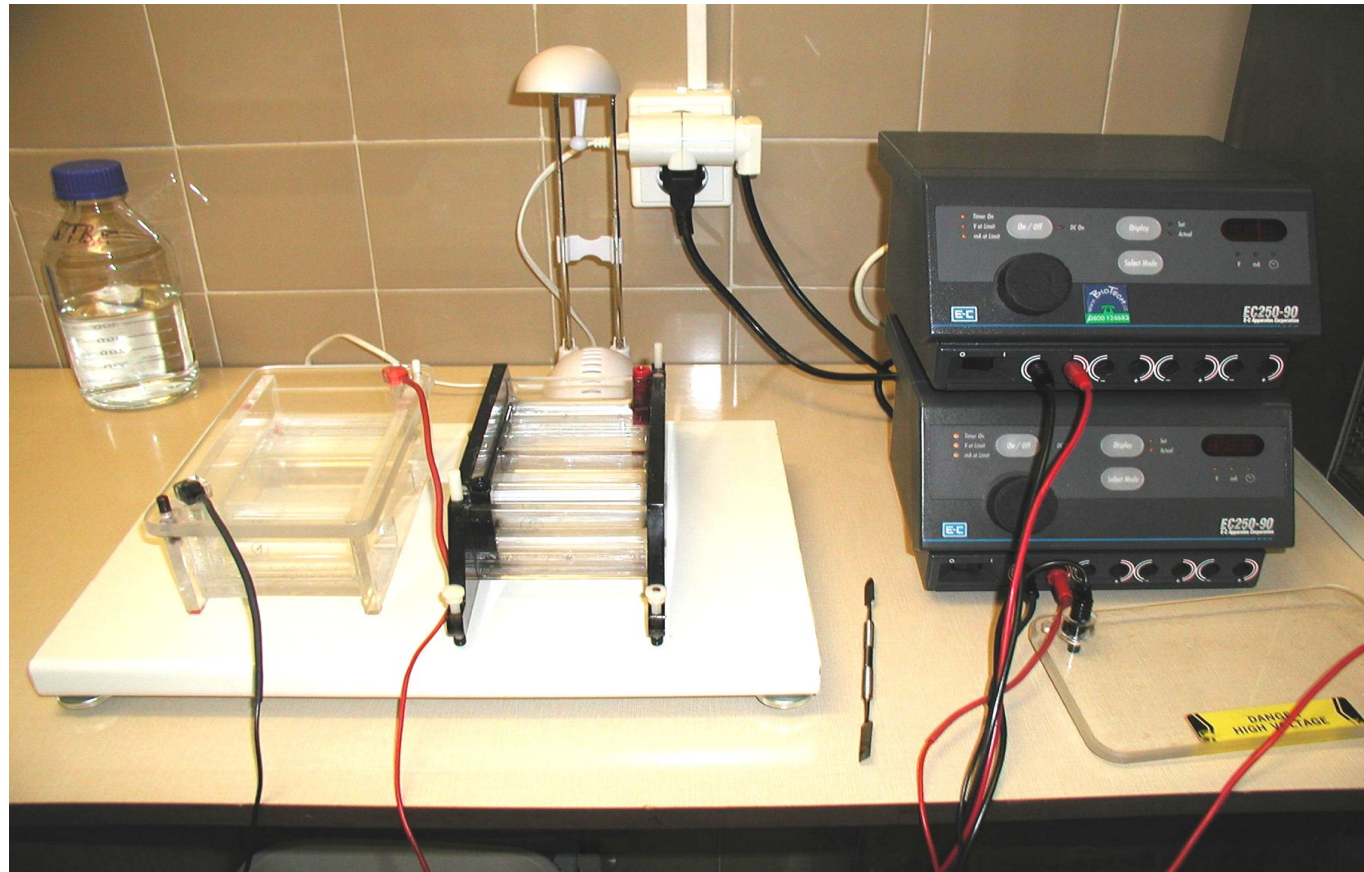


ELFO

ultracentrifugace

Gelová elektroforéza

je jednou ze základních metod molekulární biologie



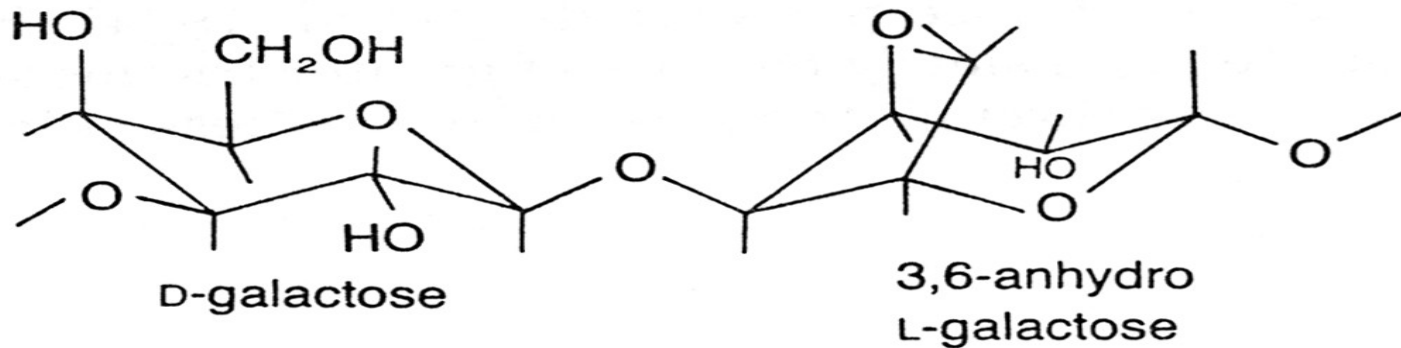
GELY

- jsou tvořeny síťovitou strukturou polymerních molekul s póry

- jako nosič se používá **agaróza** (100 – 50 000 bp)

nebo **polyakrylamid** (10 – 1 000 bp)

Základní jednotka agarózy



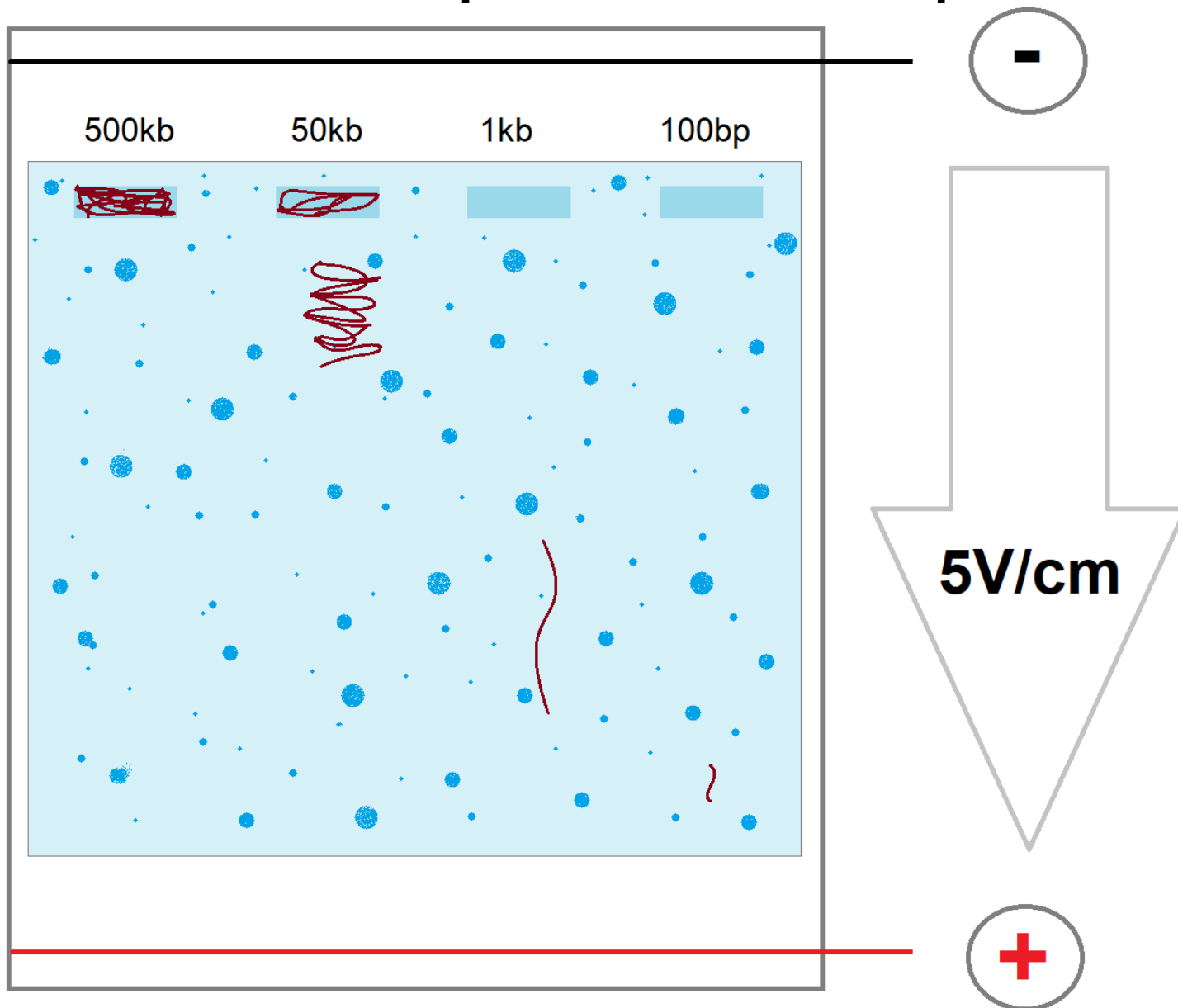
Agaróza je lineární polymer, původ z mořské řasy
různá čistota -> purifikace (nesmí obsahovat endonukleázy)

různé parametry (low melting, EEO, ...)

Polyakrylamid = polymer propenamidu a N,N-metylen-bisakrylamidu

Princip ELFO

pohyb DNA s negativním nábojem v neutrálním gelu a elektroforetickém pufri v elektrickém poli k anodě



ELFO pufry:

TRIS-acetátový (TAE): 0,04 M Tris-acetát, 0,002 M EDTA, pH 8,2

- separace lineárních molekul DNA

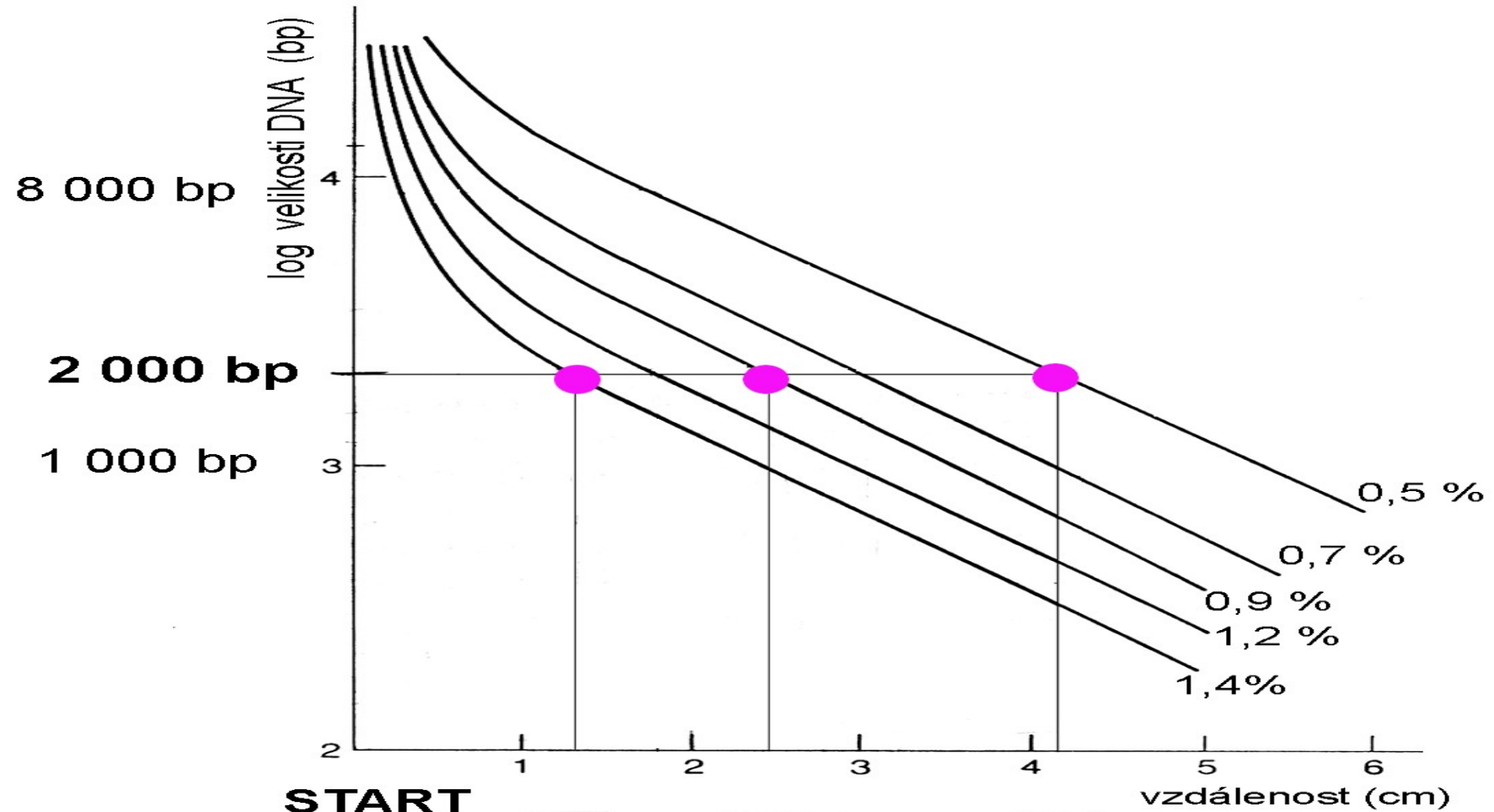
TRIS-borátový (TBE): 0,089 M Tris-borát, 0,089 M kyselina boritá , 0,002 M EDTA; pH 8,5

- separace molekul menších než 1 kb, déletrvající ELFO, vysoké napětí

TRIS-fosfátový (TPE): 0,08 M Tris-fosfát, 0,008 M EDTA, pH 7,5

- separace ssDNA

Pohyb fragmentů DNA v gelu v závislosti na jeho koncentraci

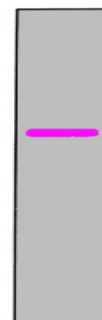


START

1,2 cm



1,4%



0,9%

2,3 cm



0,5%

4,1 cm

Separace DNA fragmentů v gelu v závislosti na koncentraci agarózy

koncentrace agarózy (%)	rozsah dělení dsDNA (kb)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 4
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Aby vzorek při nanášení do jamky klesal k jejímu dnu, míchá se s nanášecím pufrům. Tento pufr vzorek zároveň obarví a v průběhu ELFO nám putující barvička dává ilustrativní přehled o vzdálenosti, kterou vzorek o odpovídající velikosti urazil.

Obvykle bývá 4 – 6 krát koncentrovaný.

Může se použít např.

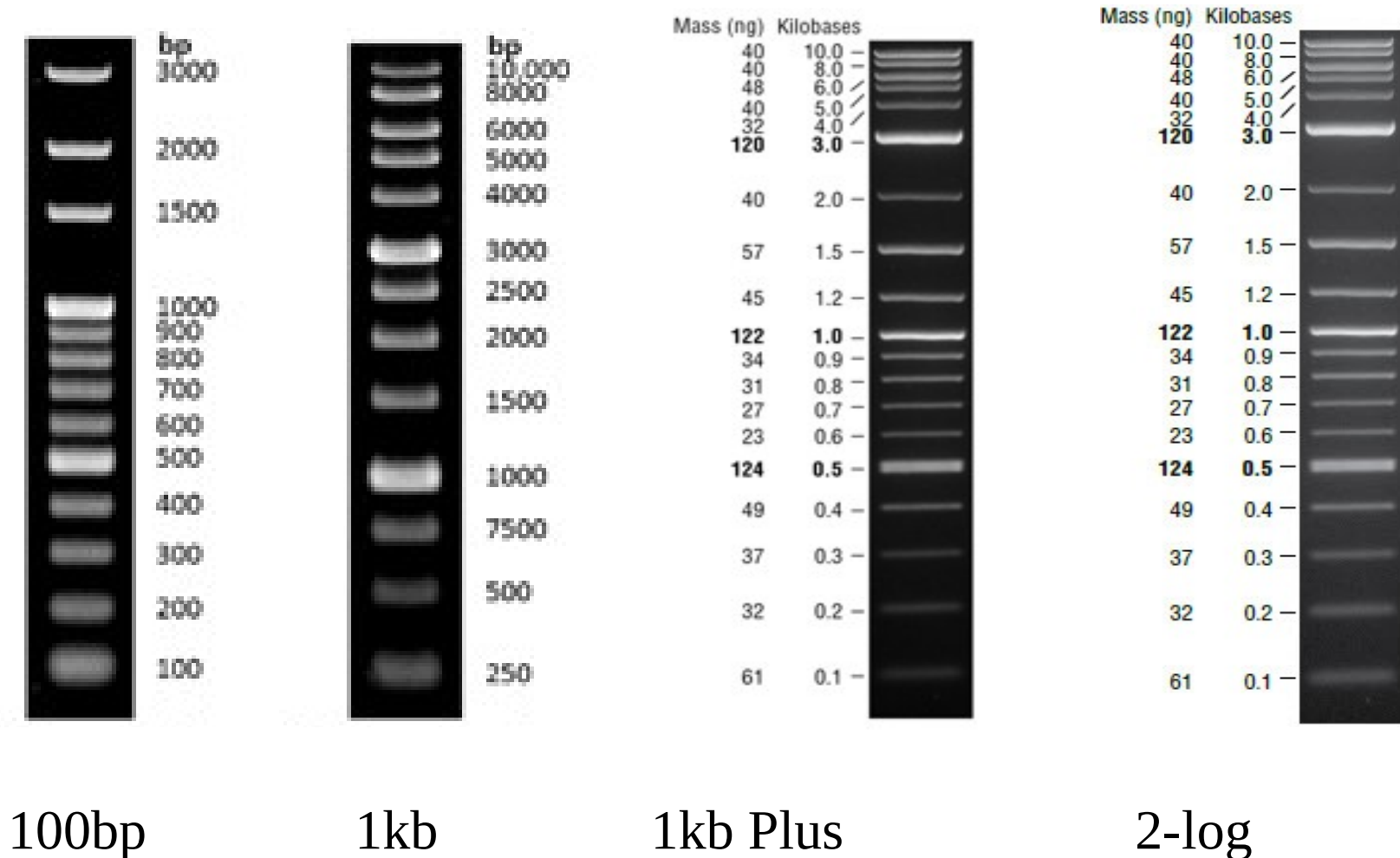
0,25% bromfenolová modř (obarví)

40% (w/v) sacharóza ve vodě (zvýší hustotu)

Existuje několik typů nanášecích pufrů, které mohou obsahovat místo sacharózy glycerol nebo Ficol 400.

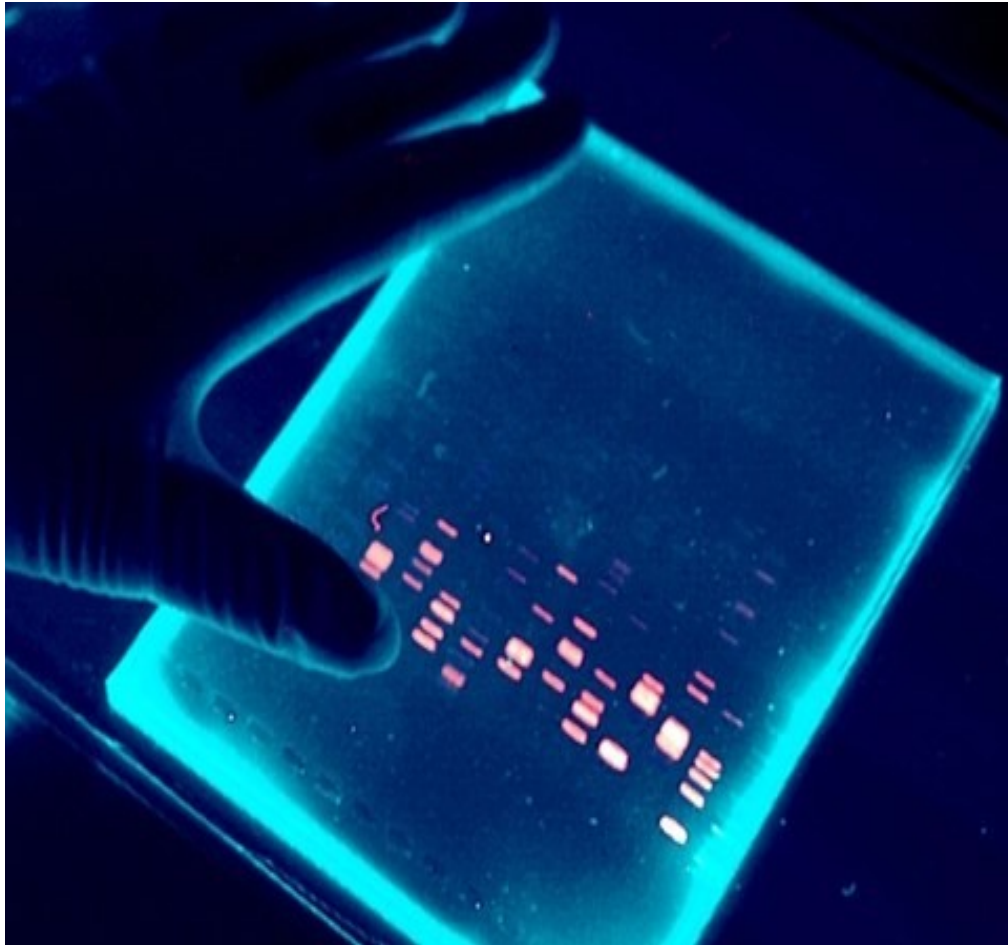


Marker = směs lineárních fragmentů DNA s definovanou délkou, umožňuje určit velikost molekul DNA (amplikony, plazmidy nebo fragmenty DNA po restriktivním štěpení) po proběhnutí elektroforézy porovnáním.



DNA fragmenty v UV světle 302 nm a fotodokumentace

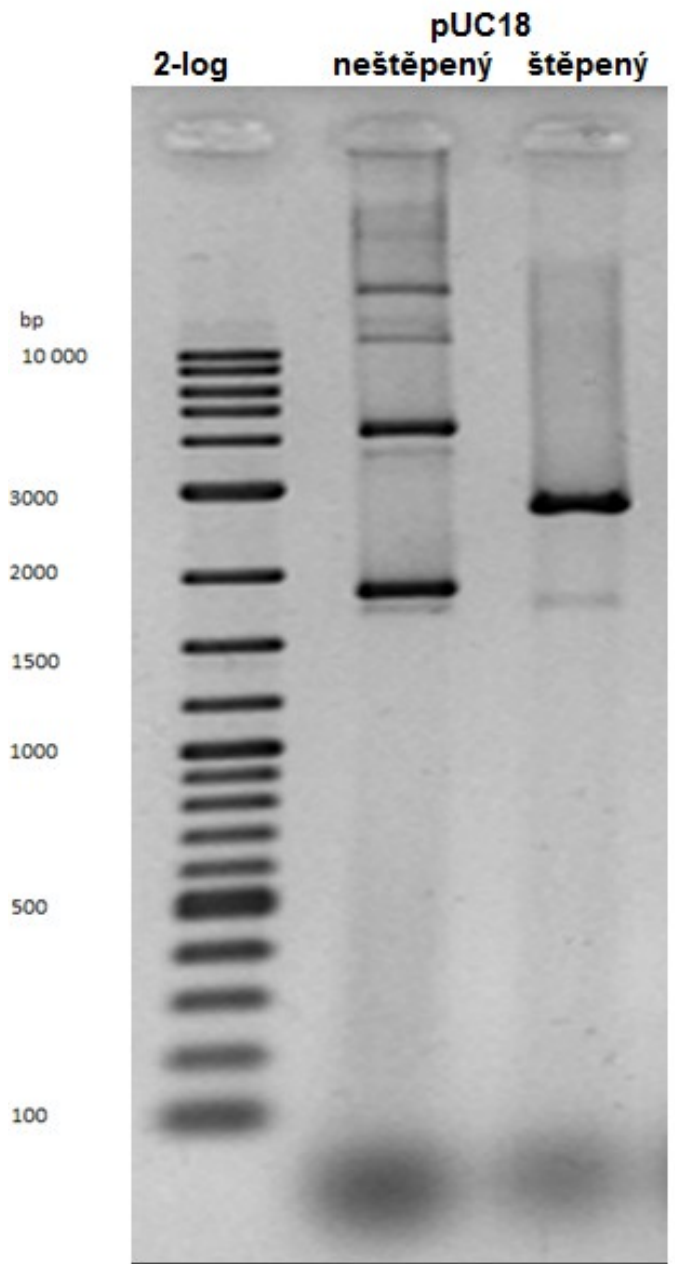
ETb



Stain G



SERVA DNA Stain G 0,3 μ l/40 ml agarózy



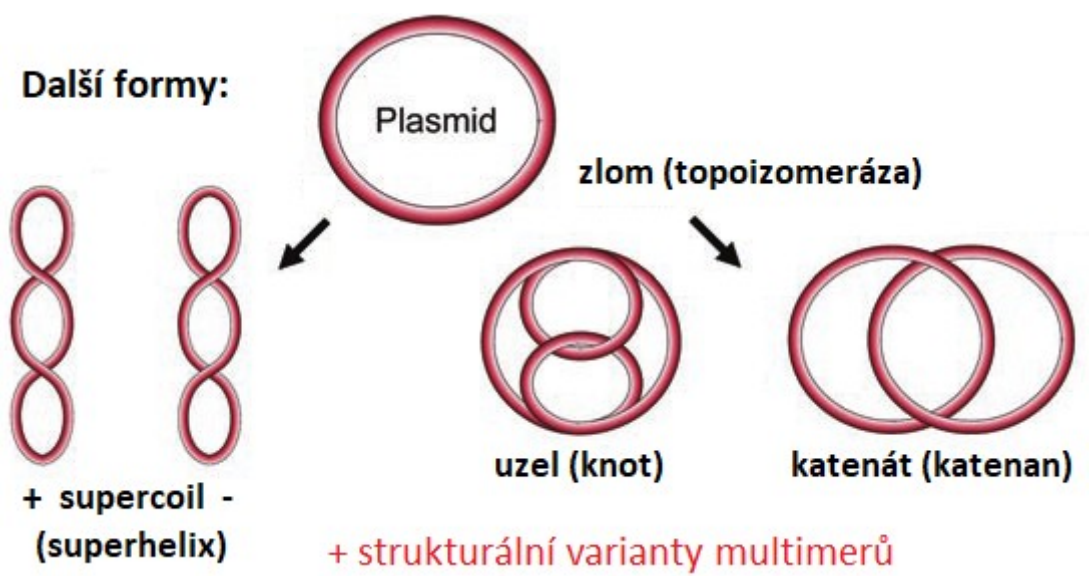
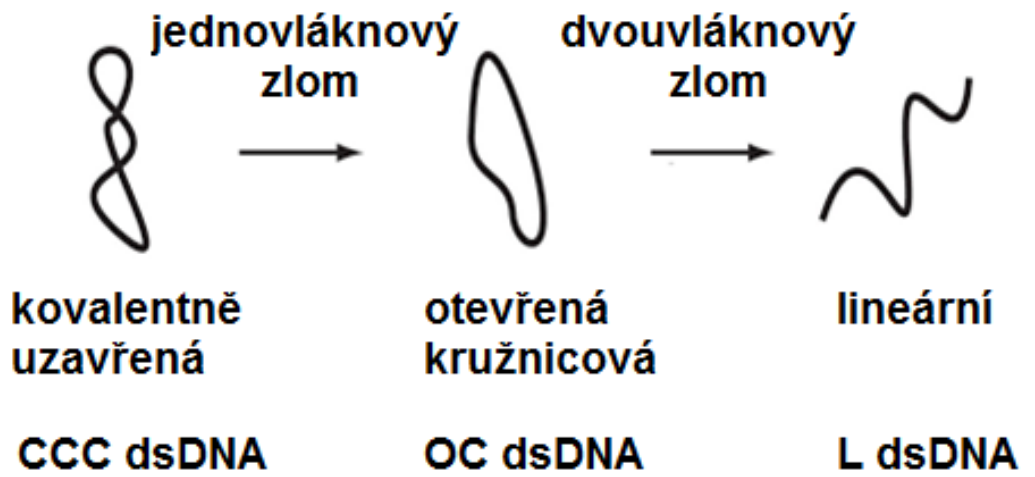
Na gelu vidíte různé proužky téhož plazmidu, tzn. kromě multimerů je délka jejich nukleotidové sekvence totožná. Která forma/proužek umožňuje spolehlivě určit velikost plazmidu? Proč?

dimery

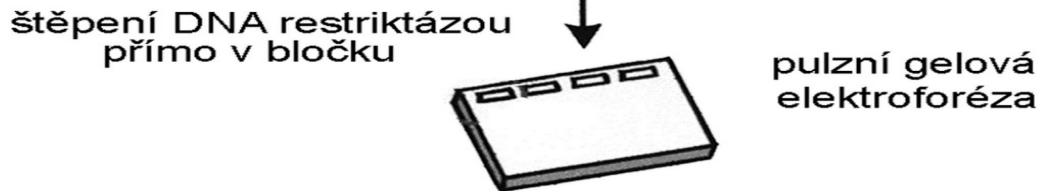
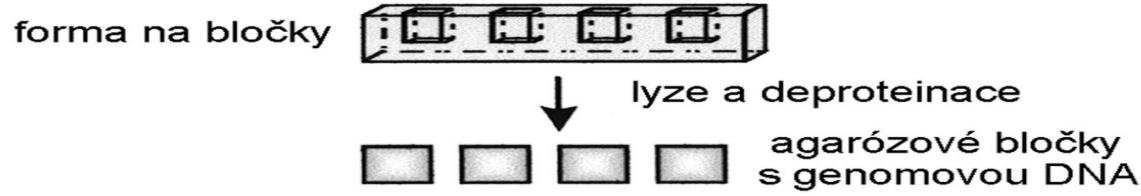
OC pDNA

Lds pDNA

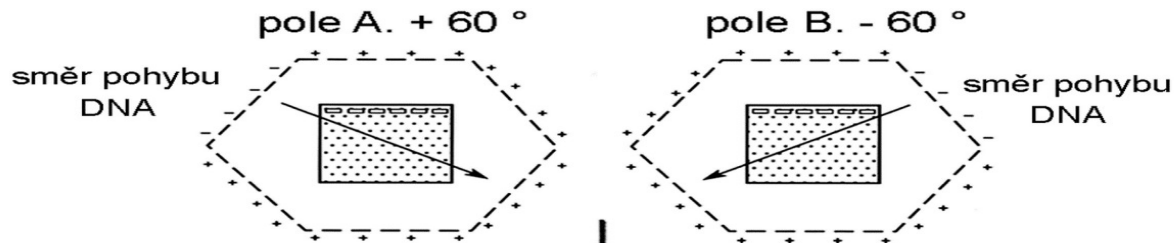
CCC pDNA



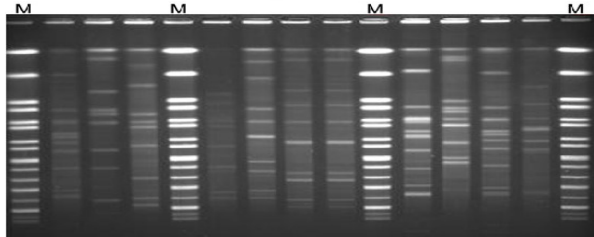
PFGE



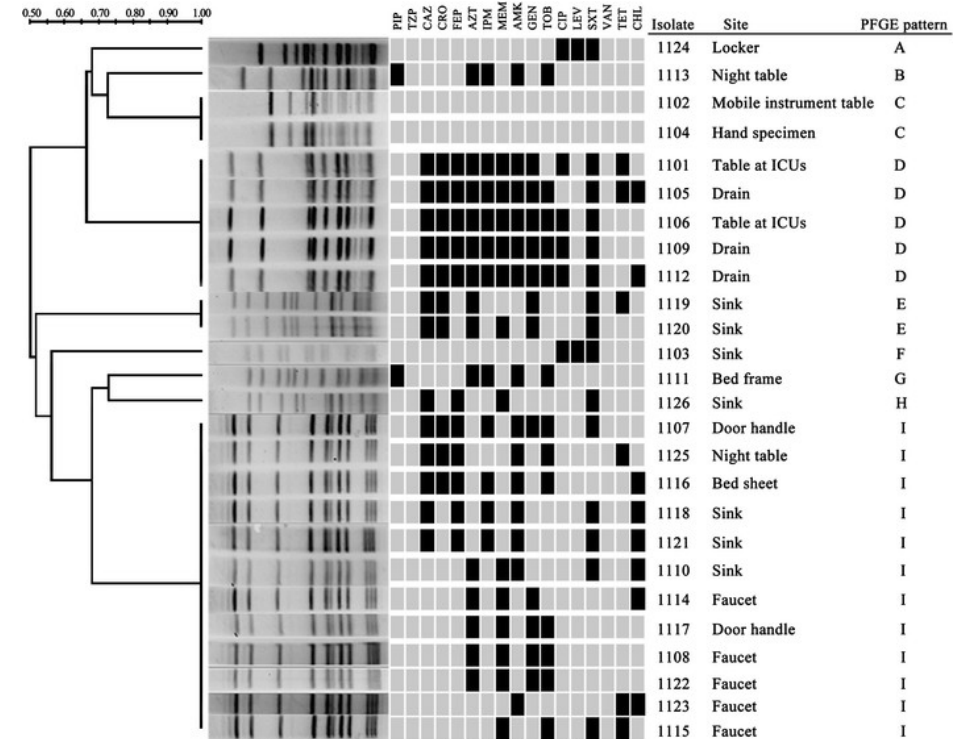
průběh za specifických podmínek CHEF Mapper system



makrorestrikční spektrum otisků DNA



numerické vyhodnocení, konstrukce dendrogramu



[ANIMATION 3D OF GEL ELECTROPHORESIS BETTER EXPLAINED - YouTube](#)

[DNA gel electrophoresis 3D animation - YouTube](#)

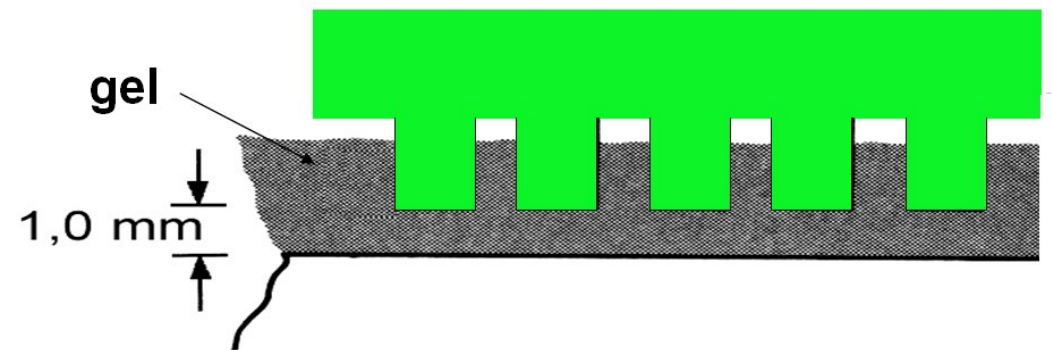
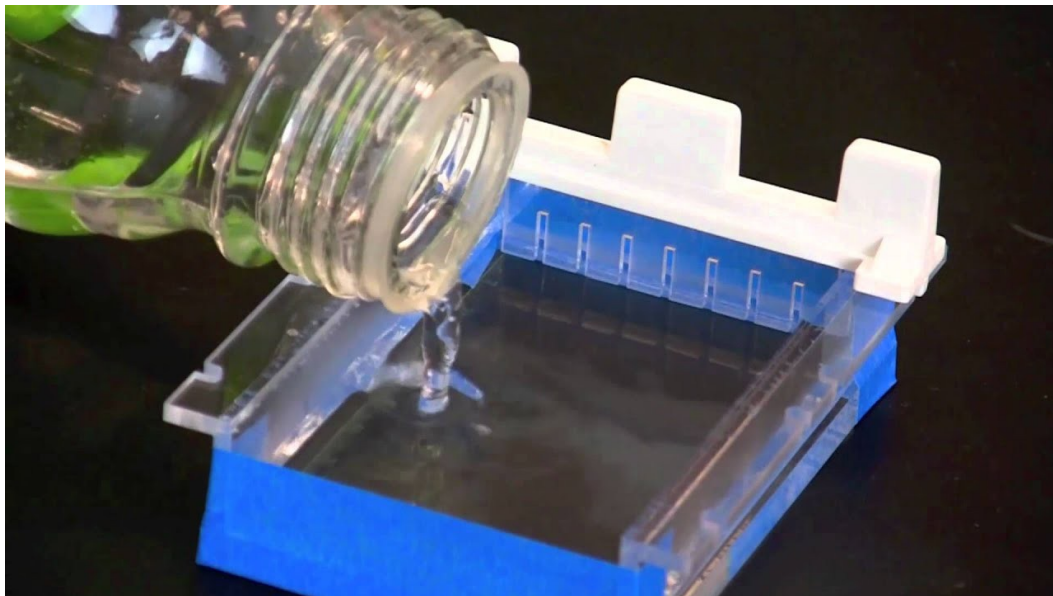
[What is Gel Electrophoresis? | miniPCR bio™ - YouTube](#)

[How to Interpret Gel Electrophoresis Results: Different types of plasmid DNA - YouTube](#)

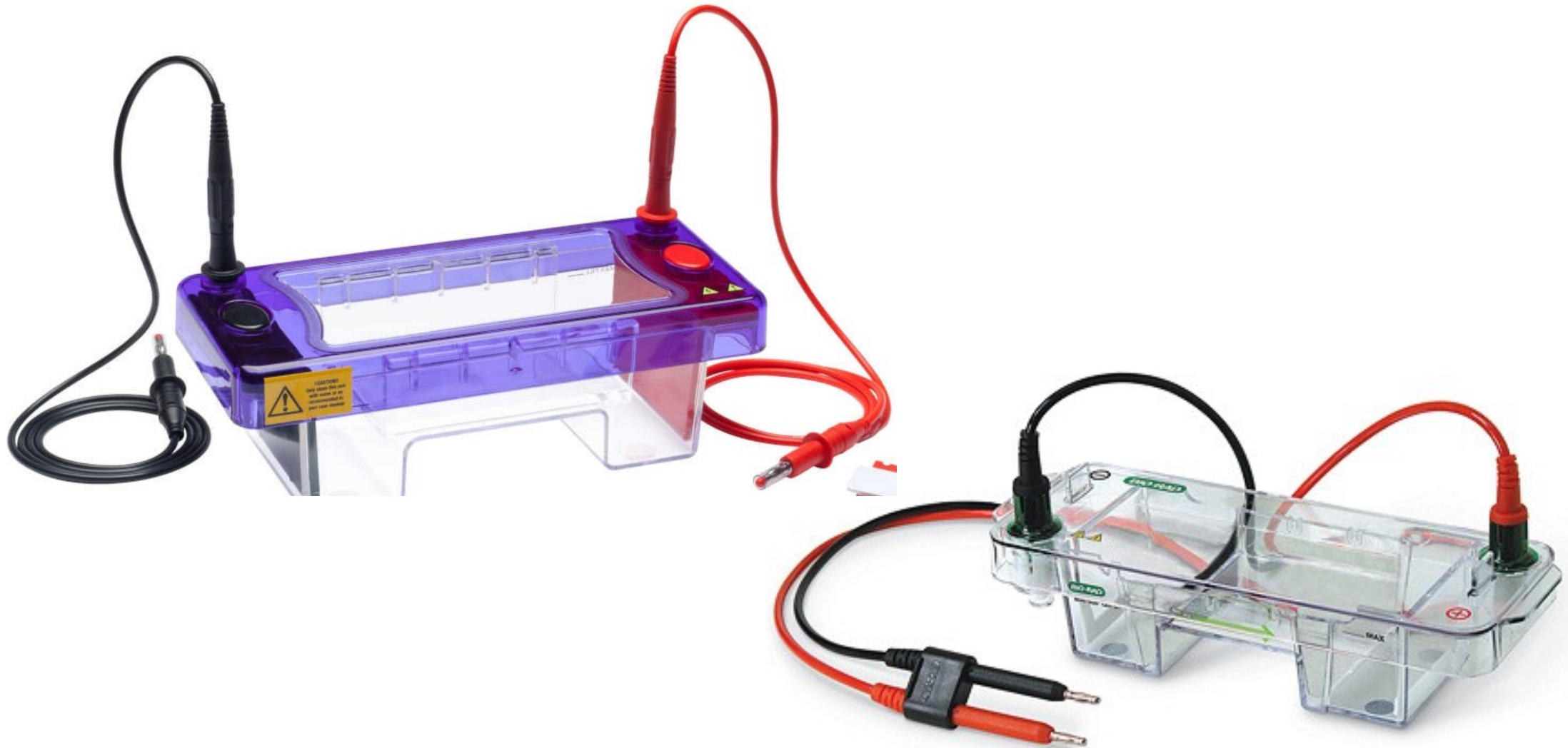
ELFO - postup

Příprava gelu pro ELFO

1. Vypočítat objem gelu (výška gelu ≥ 5 mm)
2. Připravit 500 ml 1×TAE pufr ze zásob. roztoku konc. 50×
3. Navážit agarózu a smíchat s 1×TAE pufrém tak aby vznikl 1,5% gel
4. Rozvařit agarózu 10 min/100°C
5. Opatrně promíchat, vytemperovat na 50 °C
6. Nalít do vyrovnaného tvořítka tak, aby nevznikly bubliny
7. Nechat gel ztuhnout (20 min)

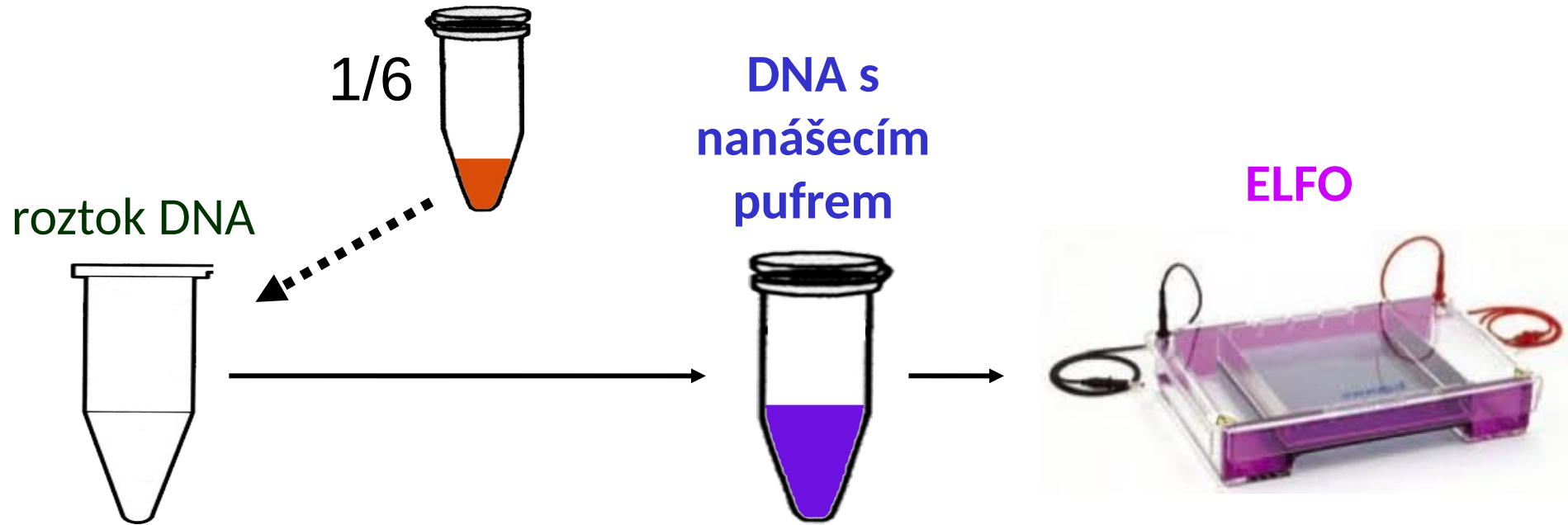


- > přenést gel i s formou do ELFO vany, hřebínek u katody (-)
- > přelít 1x TAE pufrem, hladina cca 3 - 5 mm nad gelem
- > po přelití pufrem vytáhnout hřebínek kolmo nahoru

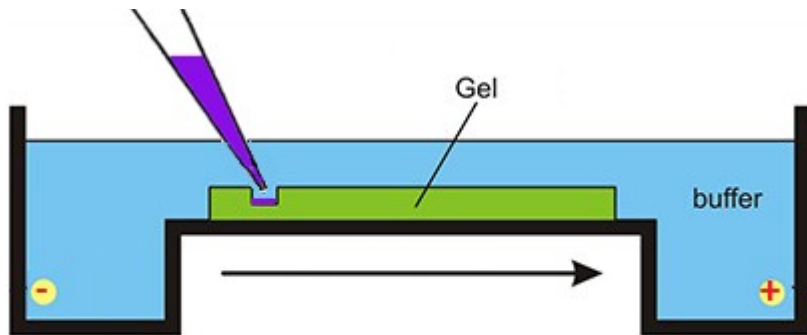


Příprava vzorku DNA pro nanášení do gelu

nanášecí pufr je 6× koncentrovaný



- 1) neštěpená vektorová pDNA: 10 μ l (500 μ g/ml) + 2 μ l NP - každý svůj vzorek
- 2) štěpená vektorová pDNA: 10 μ l (250 μ g/ml) + 2 μ l NP - každý svůj vzorek
- 3) štěpená rekombinantní pDNA: 10 μ l (250 μ g/ml) + 2 μ l NP - 1 na prac. skupinu
- 4) PCR amplikon (inzert): min. 5 μ l + 1 μ l NP - 1 na prac. skupinu



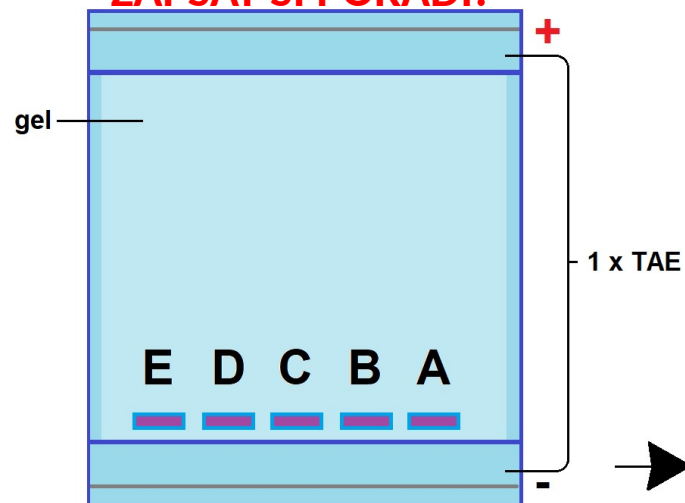
- nanášet vzorky s nanášecím pufrem
- špička pod hladinou 1× TAE pufrou
- vhodný marker (5 μ l)

Správně zapojit!

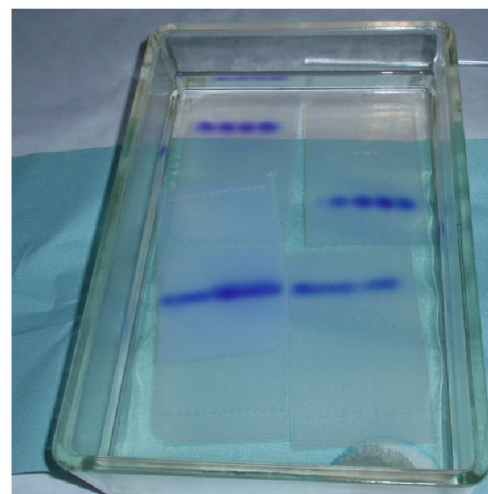
nastavit napětí 5 V/cm a spustit elektroforézu



ZAPSAT SI POŘADÍ!



NANESENÍ



BARVENÍ

20 min v roztoku
etidymbromidu
(1 μ g/ml)

! POZOR - mutagen !



DOKUMENTACE

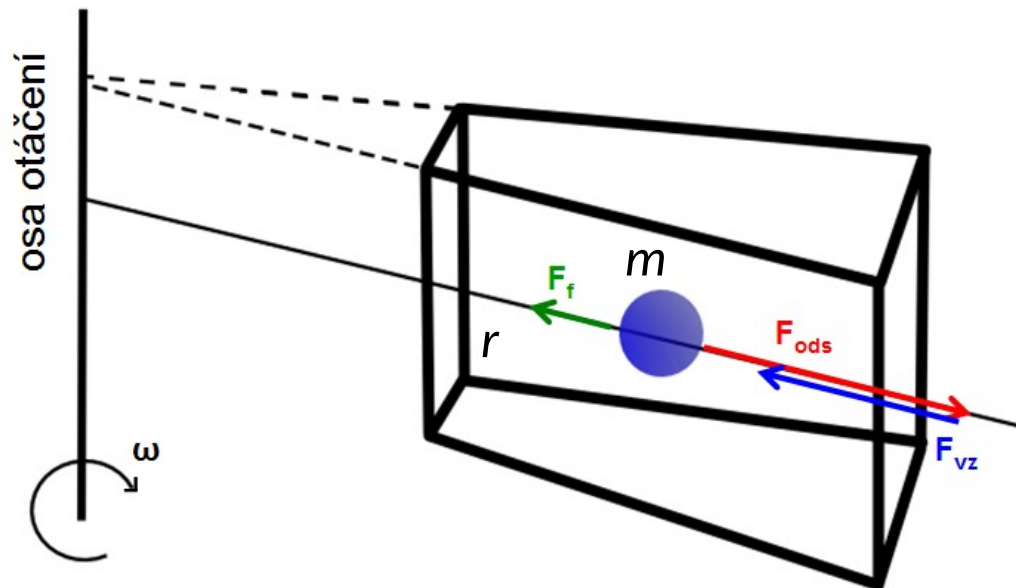


HODNOCENÍ

Centrifugace

- je separační metoda založená na pohybu částic v tekutém mediu vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy.
- během centrifugace působí na částici odstředivá síla

$$F_1 = m \omega^2 r \quad \omega = 2\pi n \quad n = \text{rpm}$$



F_f = frikční (třecí) síla

F_{ods} = odstředivá síla

F_{vz} = vztlaková síla

ω = úhlová rychlost

r = vzdálenost částice od osy otáčení

m = hmotnost částice

$\omega^2 r = a$ (zrychlení)

$F_{ods} = ma$

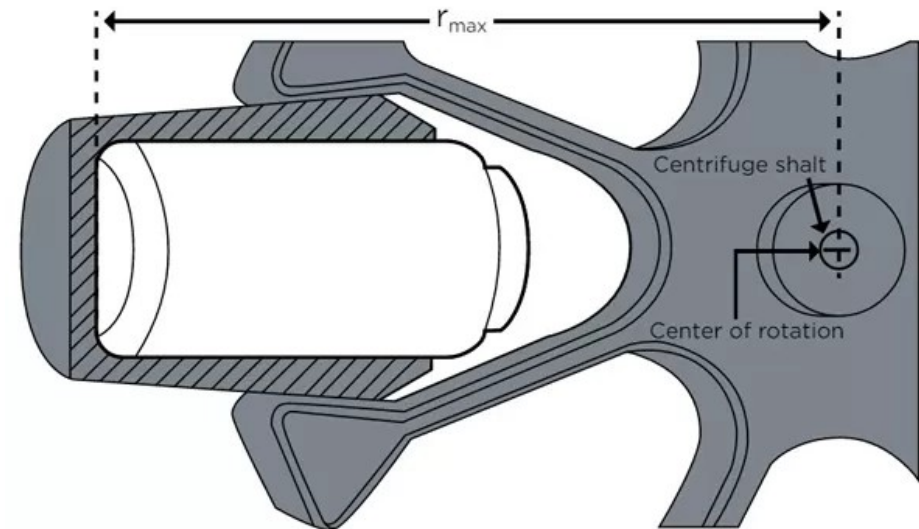
RCF versus RPM

Parametry centrifugace se nejčastěji vyjadřují jako:

RCF (relative centrifugal force, relativní centrifugační síla)

RCF se uvádí v násobcích gravitačního zrychlení g ($g = 980 \text{ cm/s}^2$)

$$RCF = 11,18 \times 10^{-6} \times r \times n^2$$

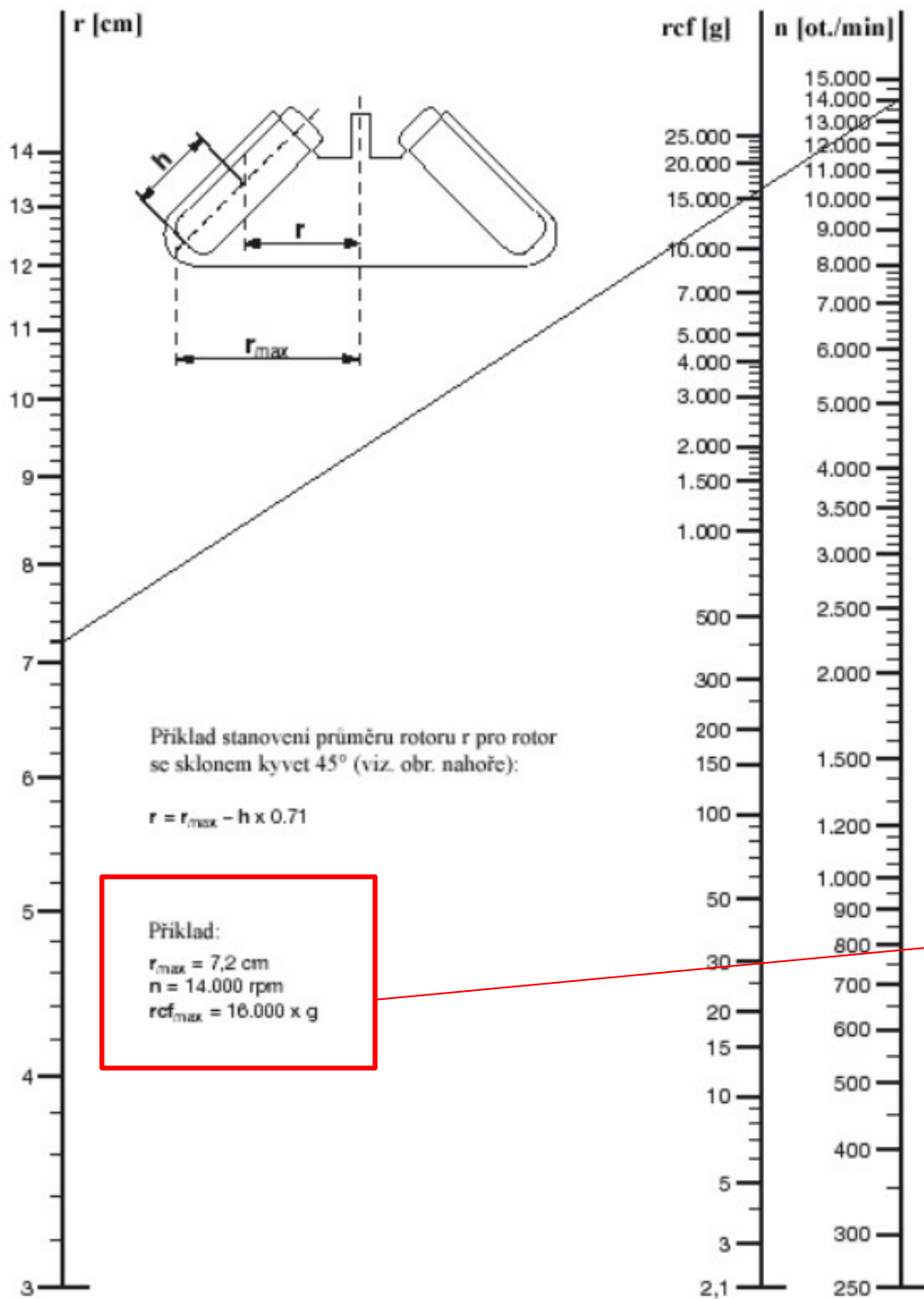


n = počet otáček rotoru za minutu (rpm)

r = vzdálenost místa od středu rotace (typ a velikost rotoru)

RCF = je relativní centrifugační zrychlení je číslo bez rozměru – udává

RPM (rotations per minute, počet otáček za minutu) kolikrát je zrychlení vyvolané rotací vyšší než gravitační zrychlení Země



Nomogram pro přepočet RCF a rpm

Nomogram pro přepočet relativní centrifugační síly (rcf) a otáček rotoru za minutu (n) v závislosti na poloměru rotoru (r).

Příklad:

$$r_{max} = 7,2 \text{ cm}$$

$$n = 14\ 000 \text{ rpm}$$

$$rcf_{max} = 16\ 000 \text{ x g}$$

Centrifugace

- Centrifugace urychlí sedimentaci pevných částic v kapalném prostředí
- Na sedimentaci má vliv:
 - Vlastnosti látek (hmotnost, velikost, tvar, hustota)
 - Vlastnosti prostředí (hustota, viskozita)
- Význam:
 - Odstranění hrubých částic z roztoku
sediment (pelet) x supernatant
 - Izolace organel a biomakromolekul
 - Stanovení základních parametrů (MW, hustota, sedimentační koeficient)

Použití

Centrifugace

Preparativní

Analytická

Rozdělení centrifug

Centrifugace

Pomalotáčková
5 000 ot/min

Rychlotáčková
25 000 ot/min

Ultracentrifugace
80 000 ot/min

ZÁKLADNÍ TYPY CENTRIFUGACE

diferenciální centrifugace v homogenním roztoku

- opakovaná centrifugace

zonální centrifugace v hustotním gradientu

podle rychlosti sedimentace

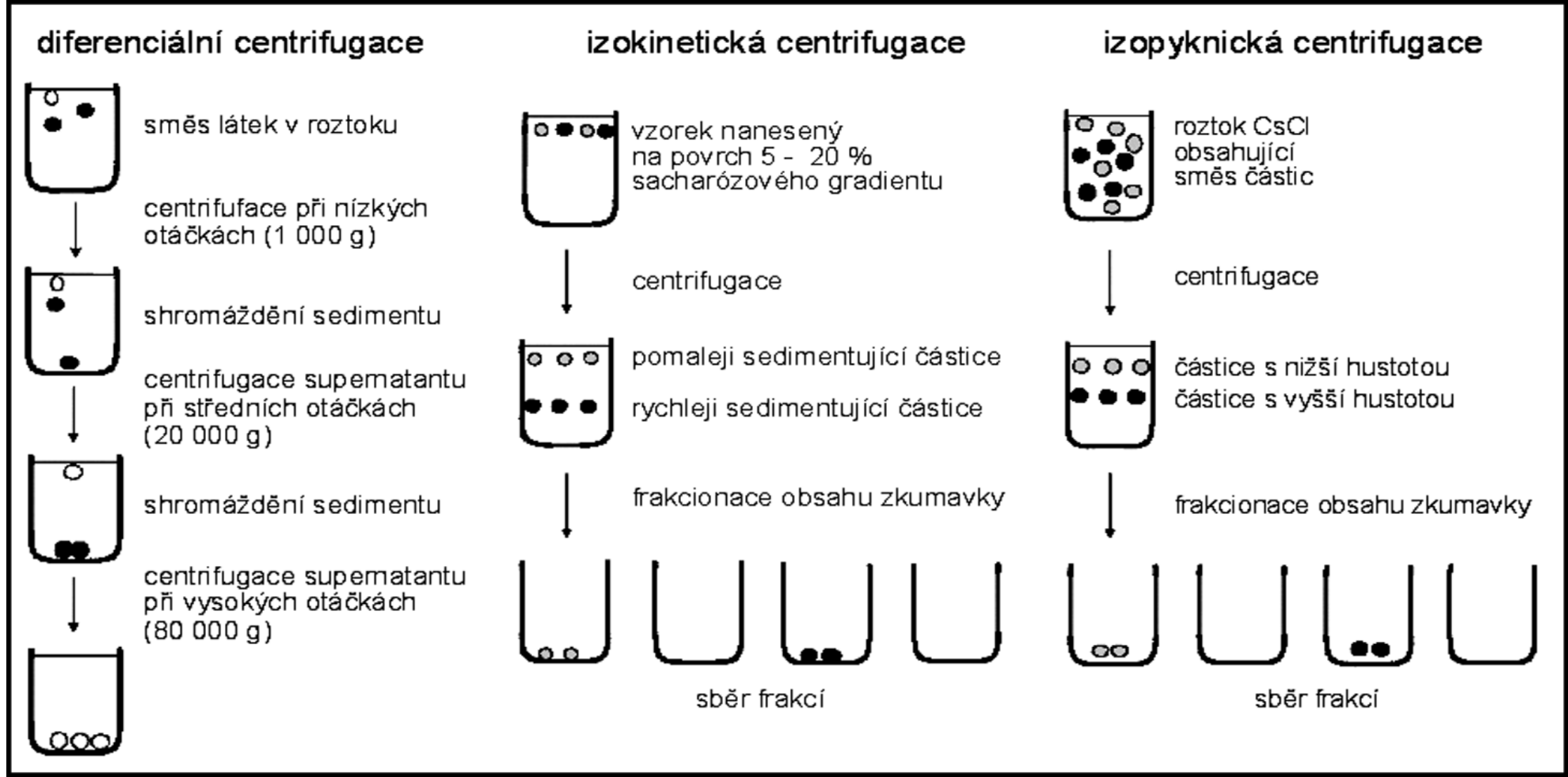
- gradient se tvoří nanášením vrstev

- sedimentační koeficient (S)

podle hustoty částic

- gradient vzniká při centrifugaci

- vznášivá hustota (ρ)



Sedimentační koeficient

= dr/dt , tj. charakterizuje rychlost pohybu částice při izokinetické centrifugaci (přepočítává se na standardní sedimentační koeficient)

Využití:

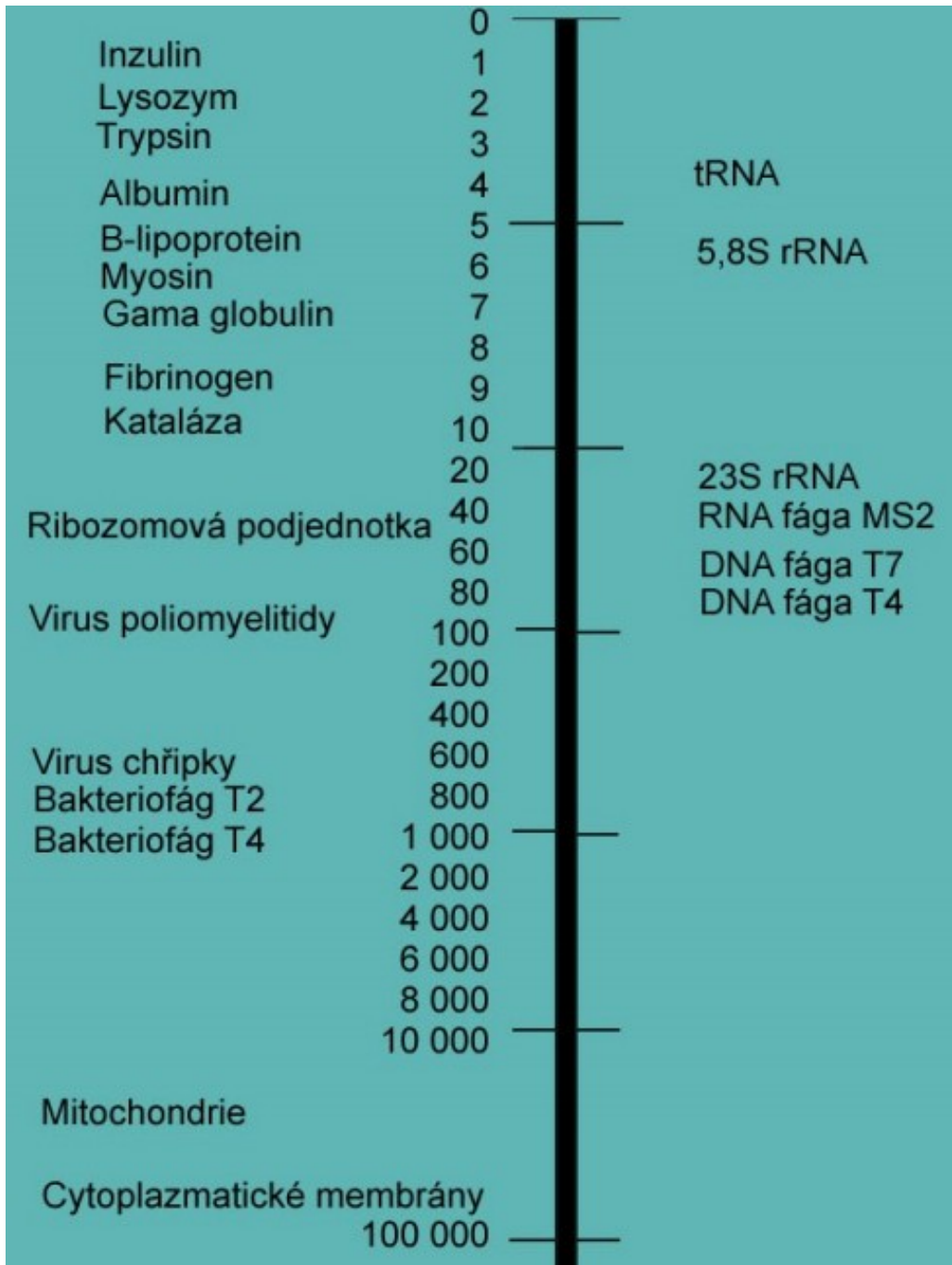
- charakterizace informačních makromolekul, buněčných organel apod. : hodnoty koeficientu se pohybují v rozmezí 10^{-11} - 10^{-13} s, proto se udává ve Svedbergových jednotkách: **1 S = 10^{-13} sekundy**
- např. 30S = 30×10^{-13} s (dále 23S RNA, 16S RNA, nebo ribozom. podjednotky 30S, 50S)

Vznášivá hustota

= hustota stanovená izopyknickou centrifugací, částice se nacházejí v oblasti, kde je hustota roztoku stejná jako hustota částic

Využití:

- separace různých forem DNA
- **dále výpočet % (G+C):** je známo, že na vznášivou hustotu dsDNA má vliv zastoupení jednotlivých typů párů bází, čehož se využívá ke stanovení podílu GC-párů ve vzorcích DNA; platí: $\% (G+C) = (\rho - 1,660/0,098) \cdot 100$

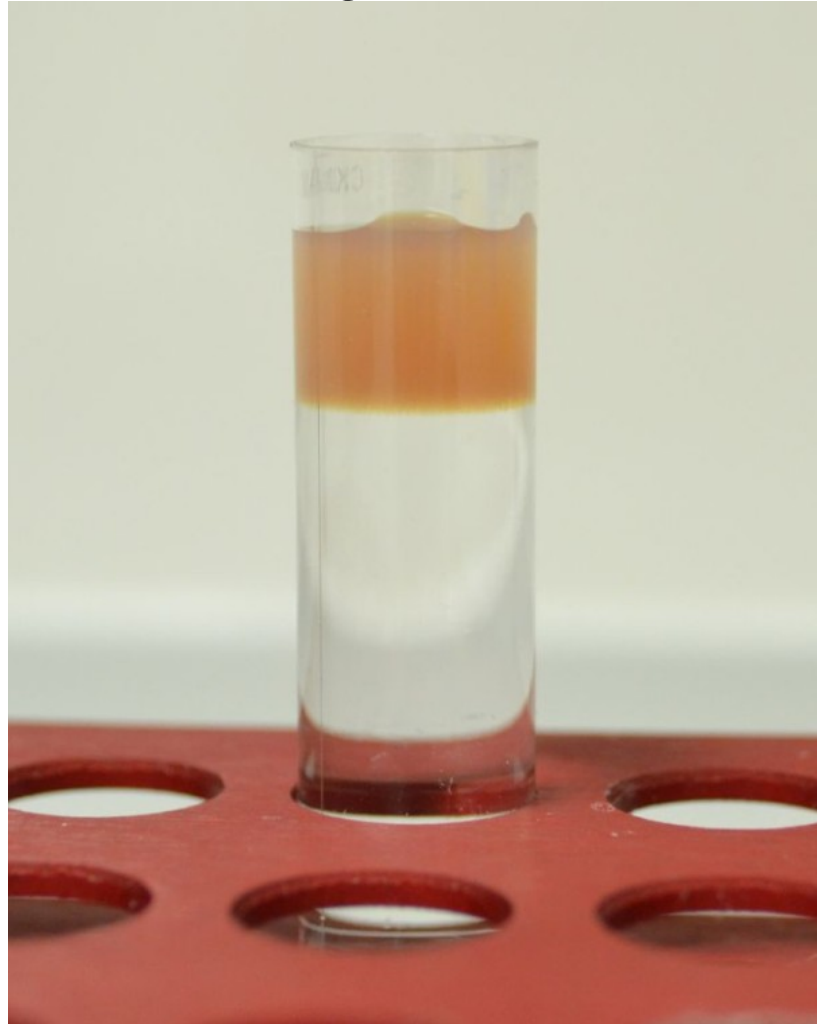


ultracentrifuga Beckman Optima XPN-90

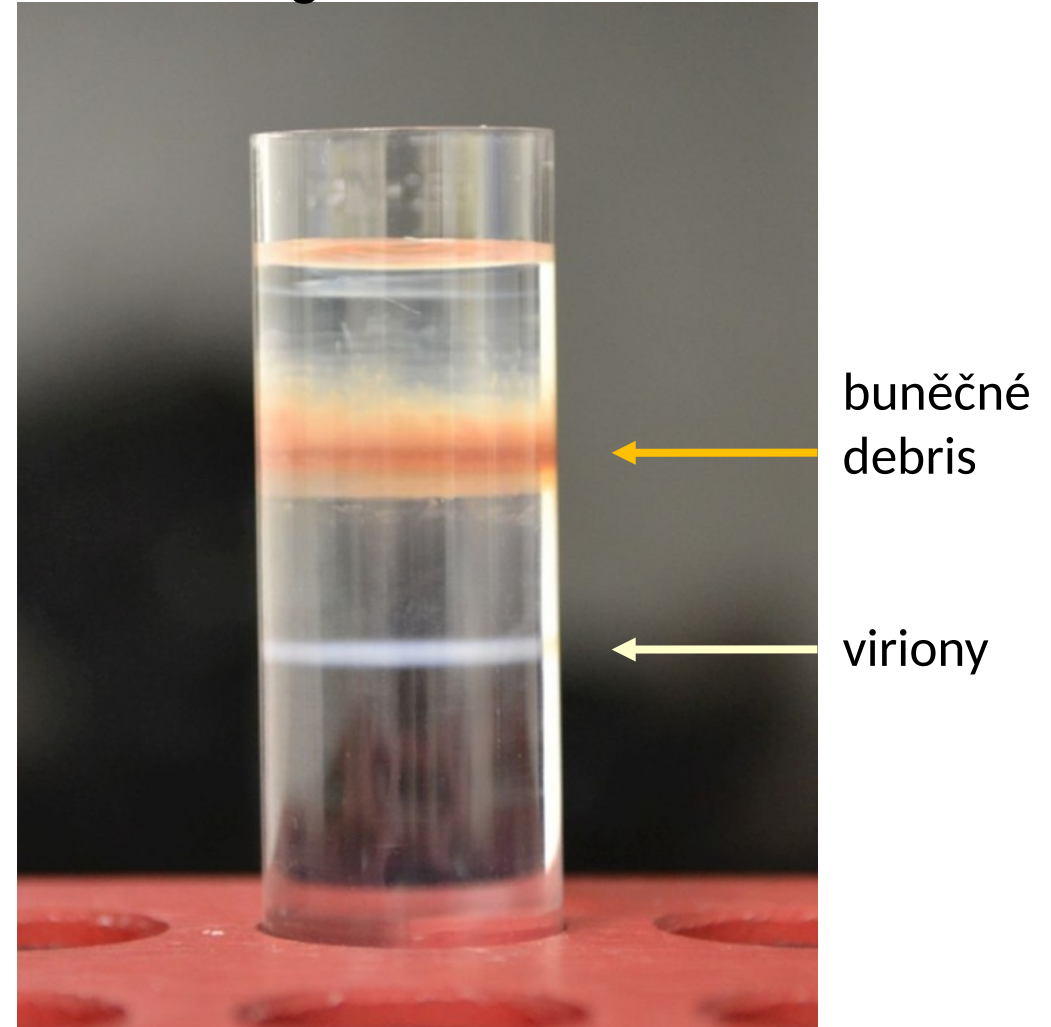


Izokinetická centrifugace zakoncentrovaného fágového lyzátu v gradientu CsCl

Před centrifugací



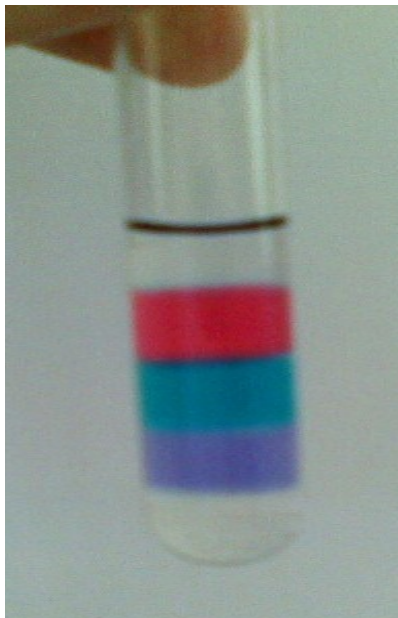
Po centrifugaci



Způsoby konstrukce sacharózového gradientu

VZORKY	převrstvování	podvrstvování	mezivrstvení
5%	5	5	5
15%	4	4	4
25%	3	3	1
35%	2	1	3
45%	1	2	2

Vrstvit po 1 ml



1. 45% sacharóza
2. převrstvení 5% sacharózou
3. mezivrstvení 25% sacharózou
4. mezivrstvení 35% sacharózou
5. mezivrstvení 15% sacharózou

