

SeparáčnÍ techniky nukleovÝch kyselin



- **Metody**

- Elektromigrační
- Centrifugační
- 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

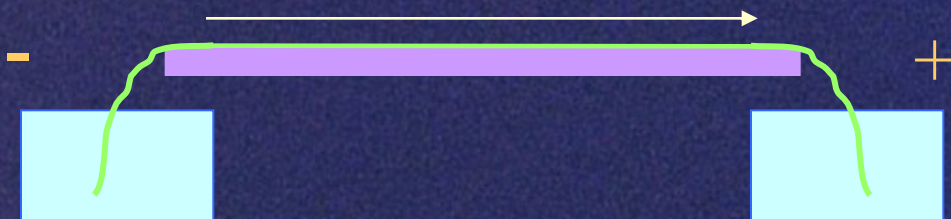
Používané nosiče



- 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

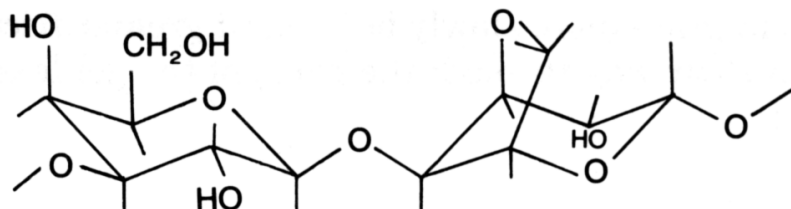
- Horizontální



- Vertikální



Agarózové gely

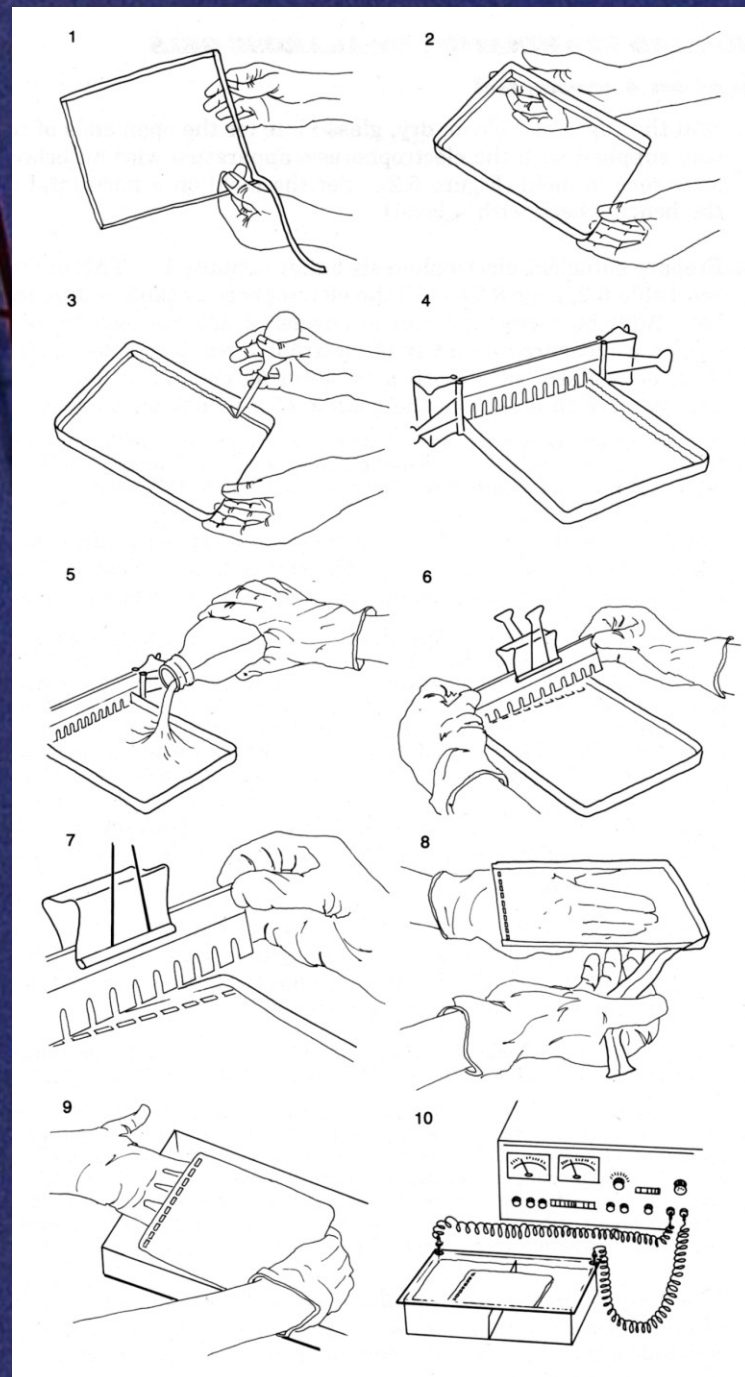
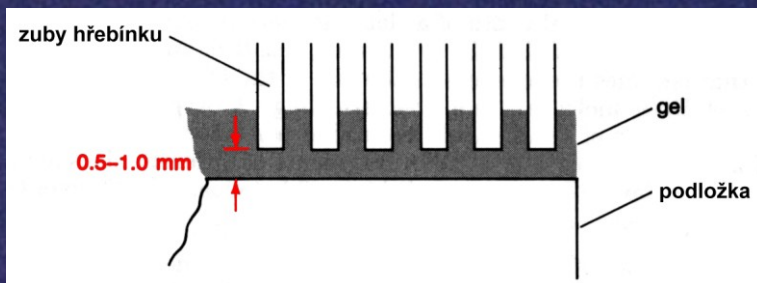


D-galaktóza

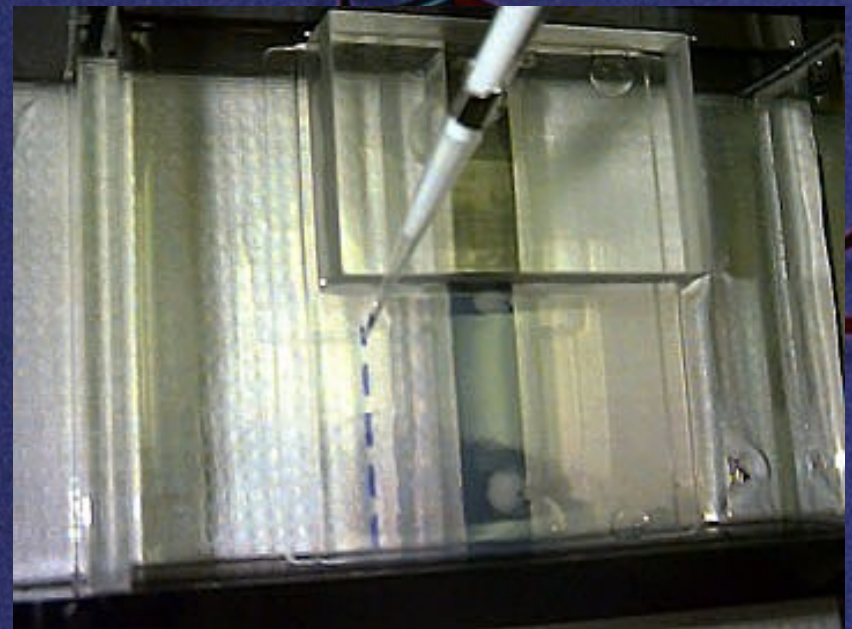
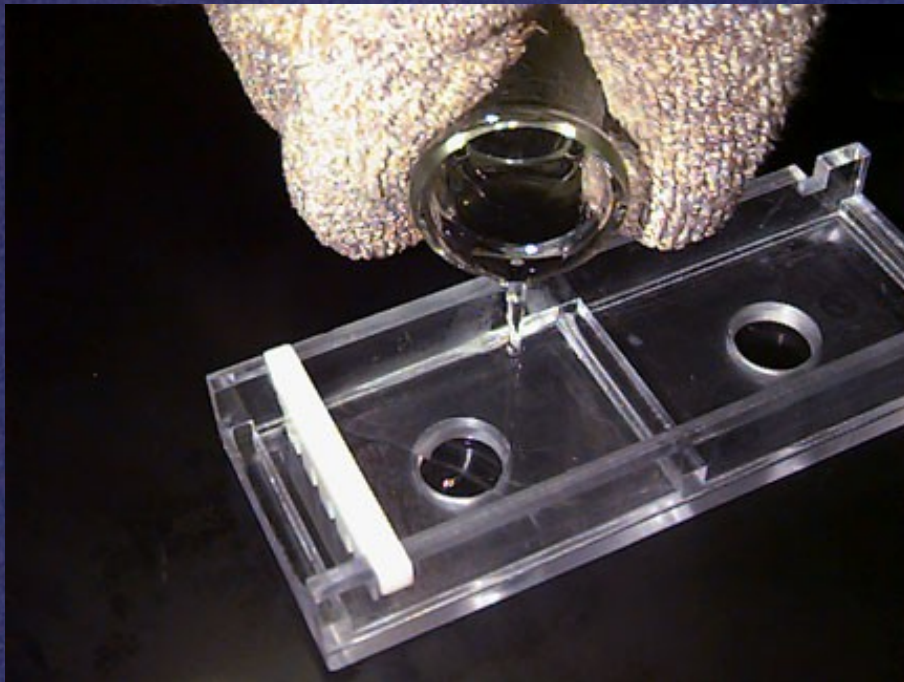
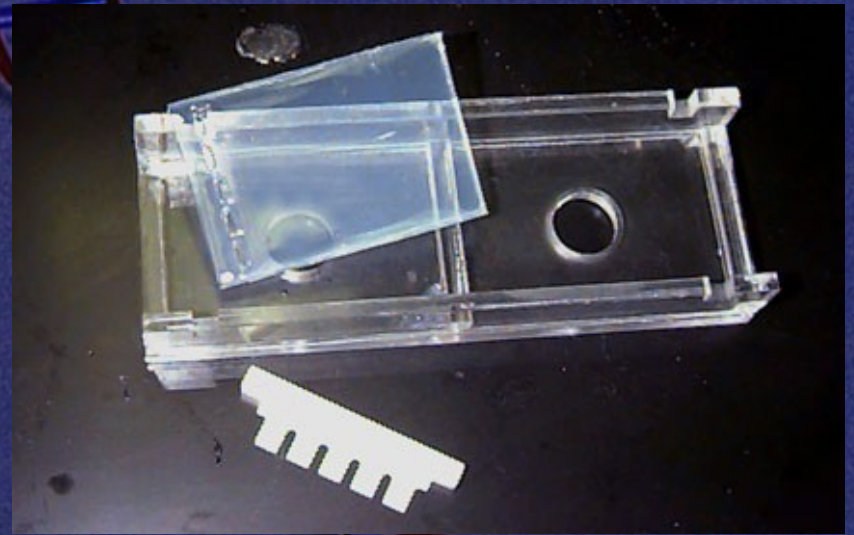
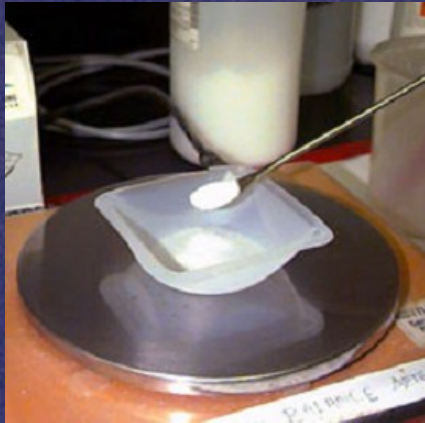
3,6-anhydro-L-galaktóza

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



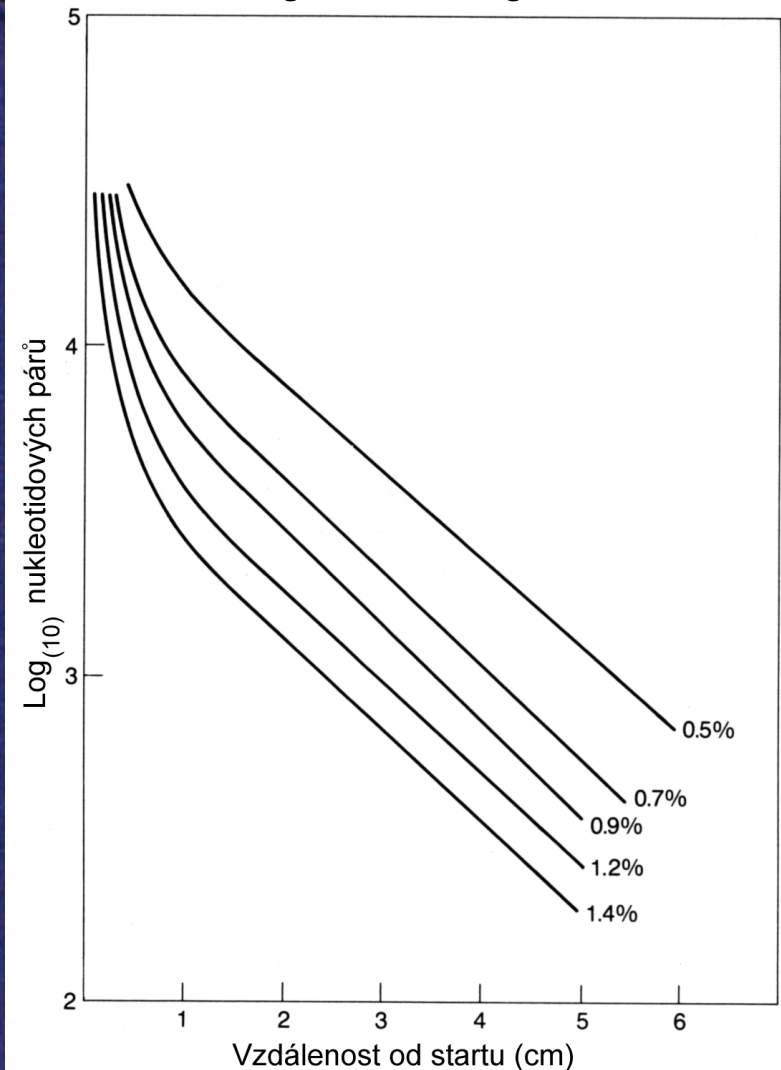
Aparatura pro horizontální elektroforézu



Elektroforetická pohyblivost DNA

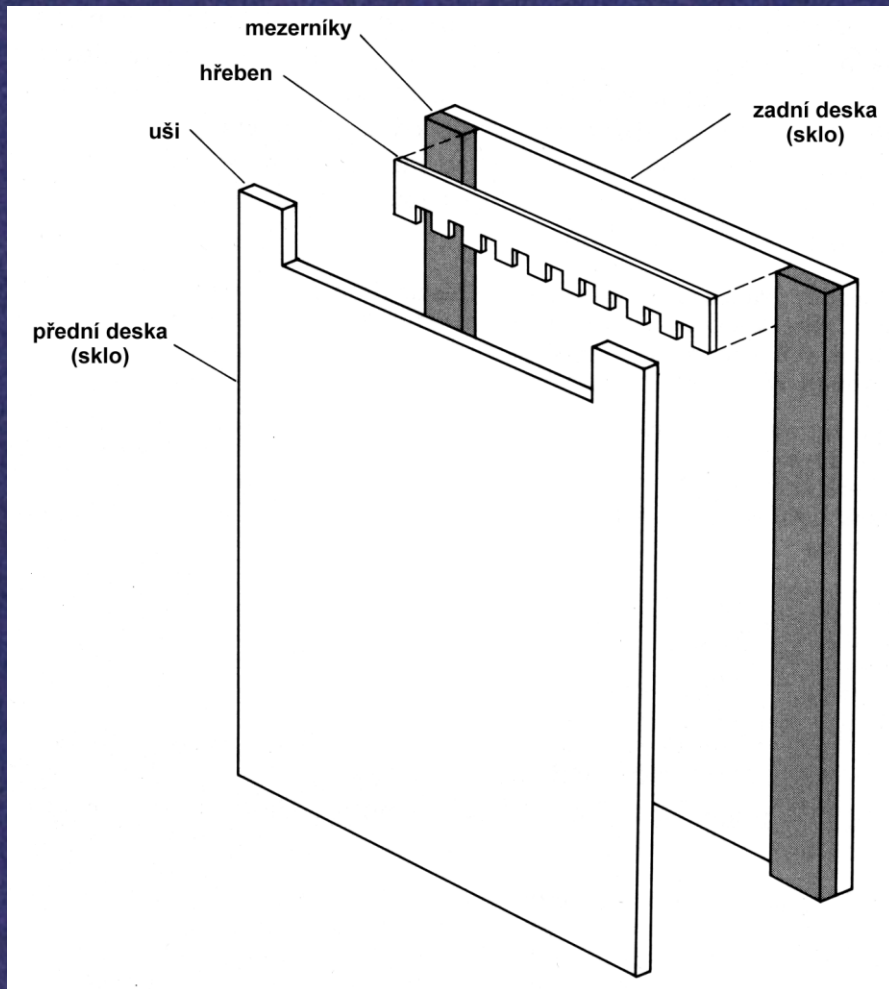
- Rychlost pohybu molekul DNA v gelu označovaná jako **elektroforetická pohyblivost je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti.**
- Velikost fragmentu DNA o neznámé velikosti lze proto stanovit srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí fragmentů o známé velikosti, 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




Aparatura pro vertikální elektroforézu

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



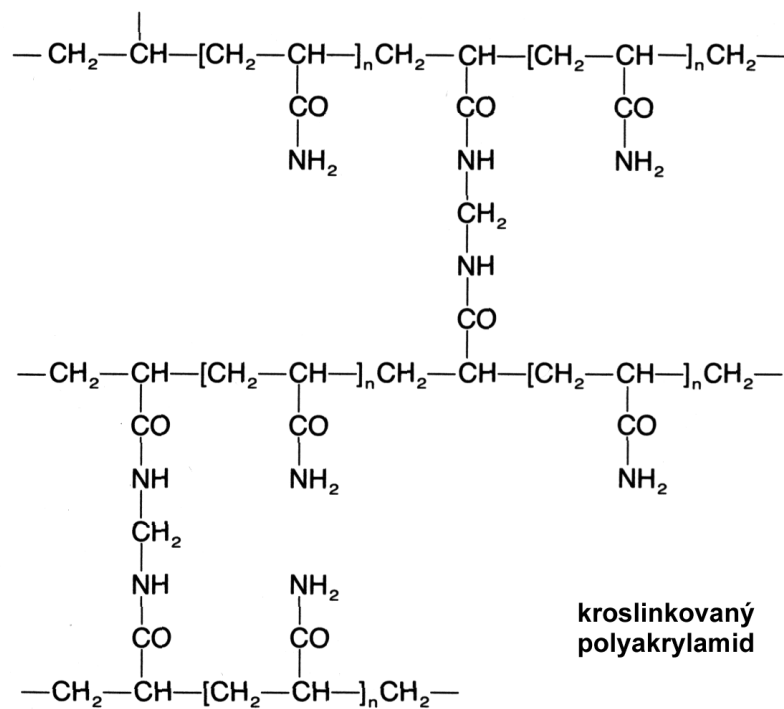
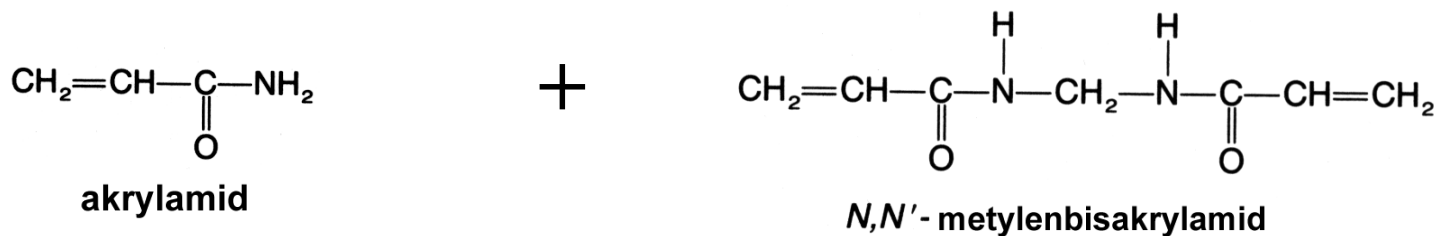
Příprava polyakrylamidových gelů

- 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



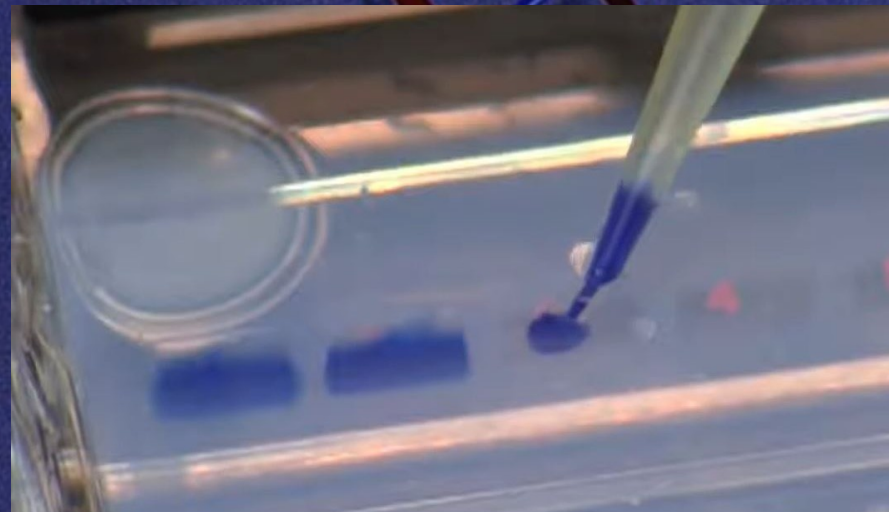
Typy polyakrylamidových gelů



- **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

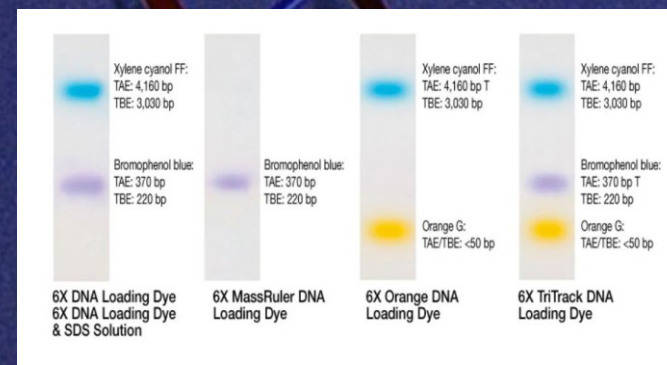
- Nanášecí pufry slouží při elektroforéze NA
 - Zvýšení hustoty vzorku - to umožní, že DNA klesne na dno jamky
 - Obarvení vzorku pro snadnější nanášení
 - Přidání pohyblivého barviva do vzorku pro možnost sledování průběhu elektroforézy
- Rozdělení nanášecích pufků
 - Založené na sacharóze
 - Založené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



Přehled pohyblivých barviv v nanášecích pufrech

Migrace barviv je více ovlivněna nábojem a pufrem než velikostí molekuly

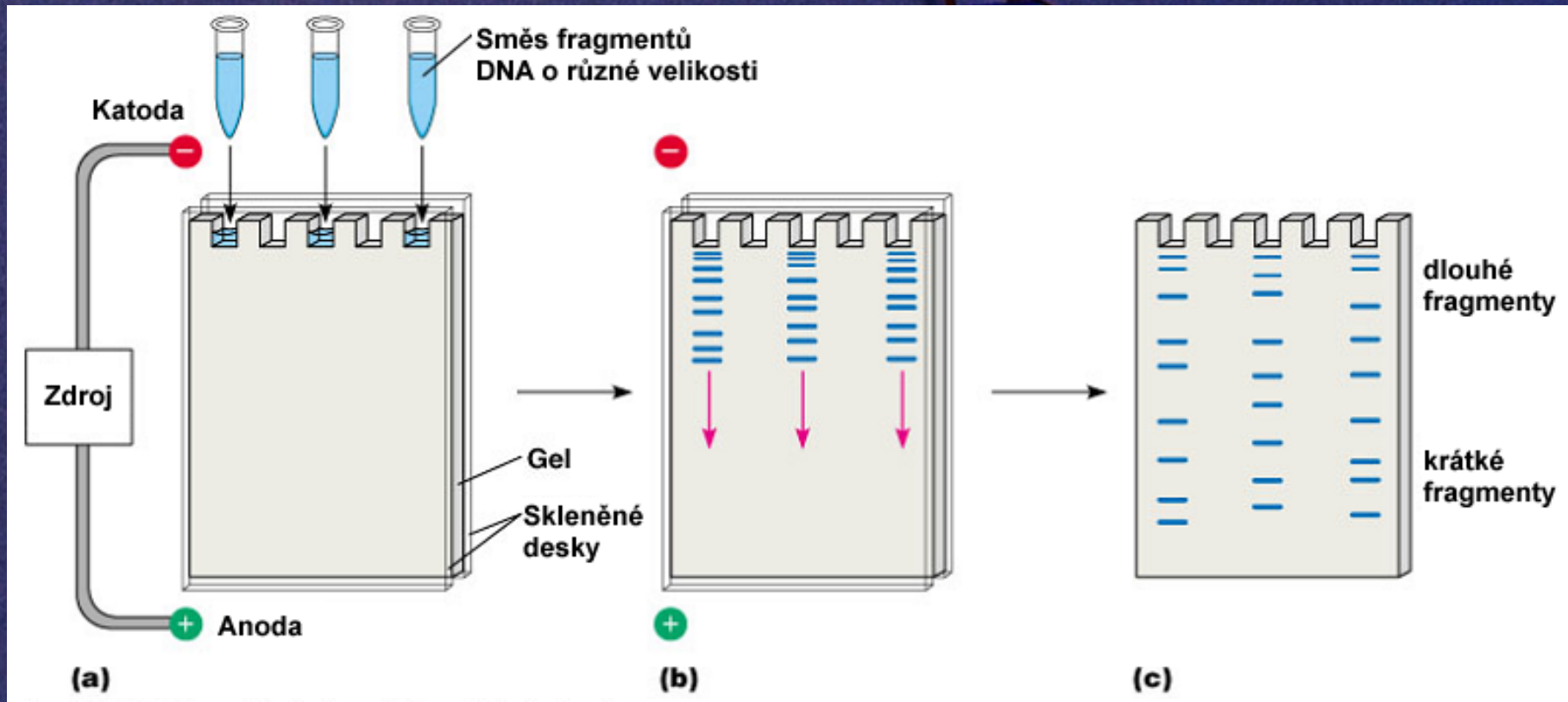
	0,5 – 1,4 % agaróza	4 % polyakryl- amid	6 % polyakryl- amid
Xylencyanol	4 kb	170 bp	105 bp
Bromfenolová modř	300 bp	40 bp	25 bp
Oranž G	50 bp	-	-
Bromkresolová zeleň	Pouze pro alkalickou elektroforézu 100 bp		



Používané elektroforetické pufry

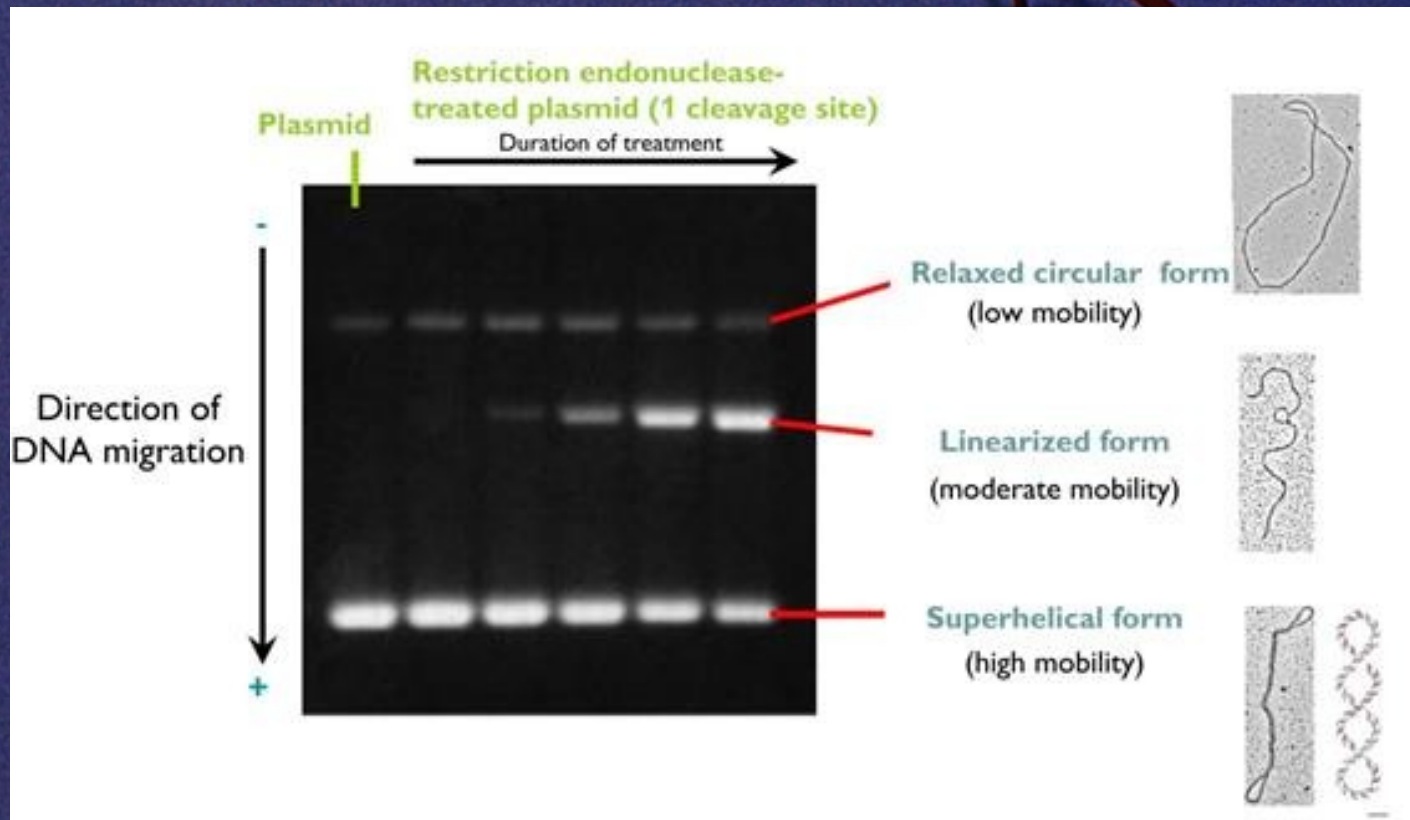
Pufř	Zkratka	Pracovní koncentrace	Zásobní koncentrace
Tris-acetátový	TAE	1 : 0,04 M Tris-acetát 1 mM EDTA	50
Tris-fosfátový	TPE	1 : 0,09 M Tris-fosfát 2 mM EDTA	10
Tris-borátový	TBE	0,5 : 45 mM Tris-borát 1 mM EDTA	5
Alkalický		1 : 50 mM NaOH 1 mM EDTA	1
Tris-glycinový		1 : 25 mM Tris 250 mM glycin 0,1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

Provedení elektroforézy



Shlédnout video: How To Load and Run Agarose Gel Electrophoresis (BioRad) <https://www.youtube.com/watch?v=uAttNVEEEwY>

Konformace DNA ovlivňuje mobilitu v gelu



Forma II

Forma III

Forma I

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 (interkalační nebo povrchové struktury)
 - Zbarvení je proporcionální koncentraci DNA a tím i velikosti fragmentů
 - Příklad: Spolehlivě detekovatelné množství DNA etidiumbromidem 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

Rozdělení barviv pro detekci nukleových kyselin

• Klasická barviva NA

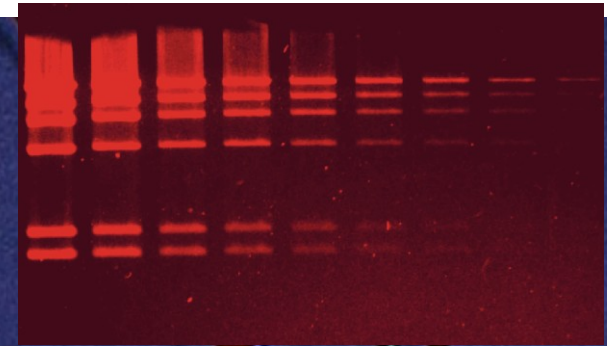
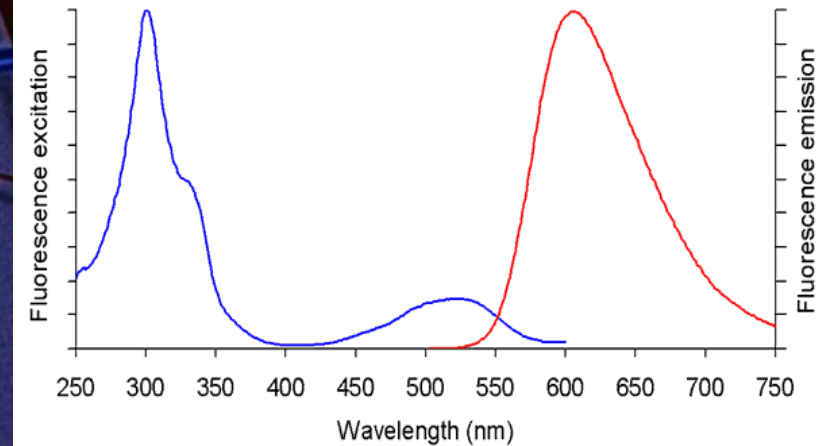
- Interkalační fenantridinová barviva
 - Etidium bromid
 - Etidium homodimer
 - Propidium jodid
- Indolová a imidazolová barviva vázající se na menší žlábek
 - DAPI
 - Hoechst (bis-benzimid)
- Další barviva
 - Akridin oranž
 - 7-amino-aktinomycin D
 - Hydroxystilbamidin
 - LDS 751
- Nevyžadující detekci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

• Kyaninová barviva

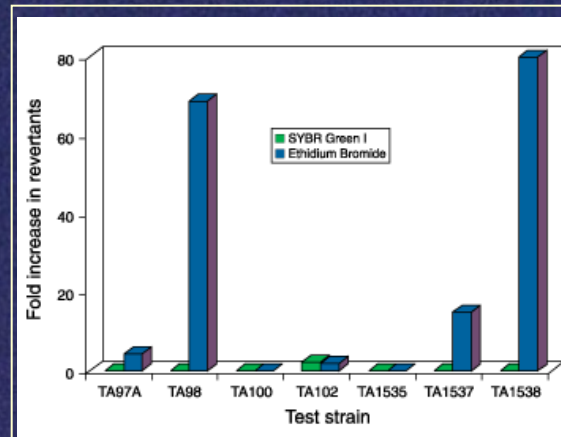
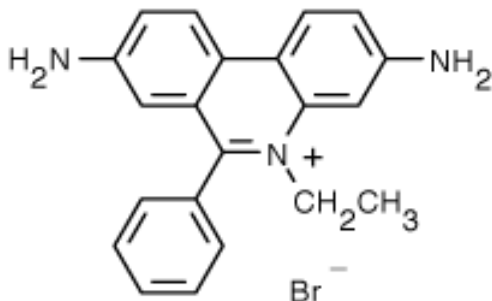
- Původní patentovaná
 - Pro barvení gelů
 - SYBR Gold
 - SYBR Green I a II
 - SYBR Safe
 - Pro kvantifikaci
 - EVA Green
 - PicoGreen
 - OliGreen
 - RiboGreen
- Pro buňky impermeabilní s vysokou citlivostí
 - TOTO, TO-PRO a SYTOX
- Pro buňky permeabilní
 - Cytologická barviva SYTO
- Chemicky reaktivní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

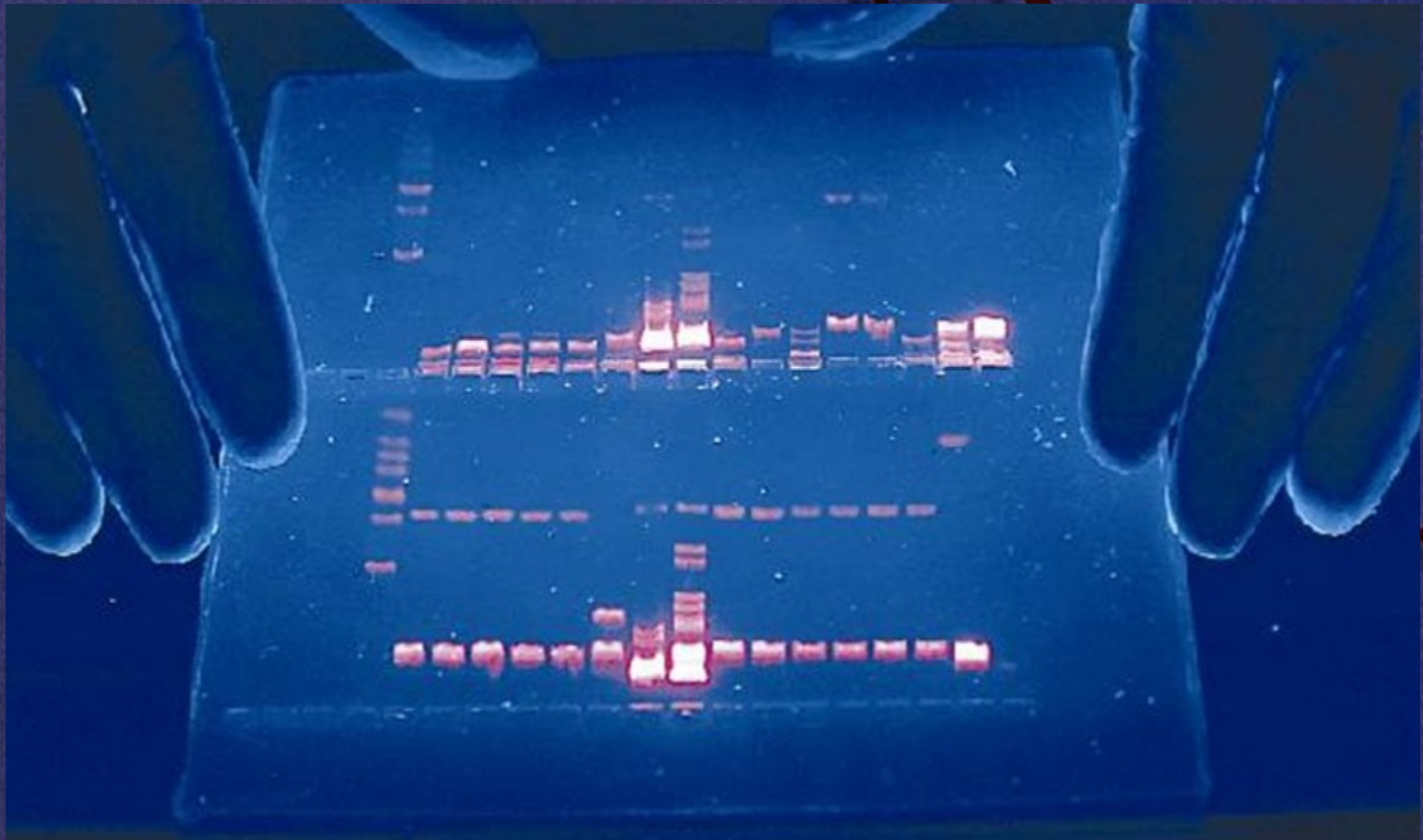


Etidium bromid (fenantridinium, 3,8-diamino-5-etyl-6-fenyl-bromid)



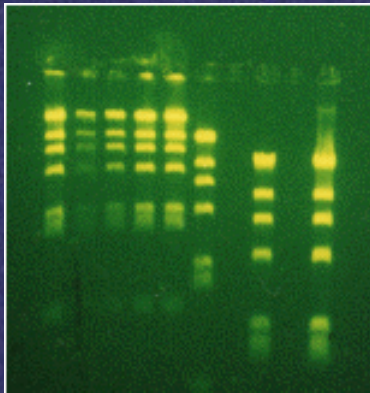
Srovnání výsledků
Amesova testu
u EtBr a SYBR

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

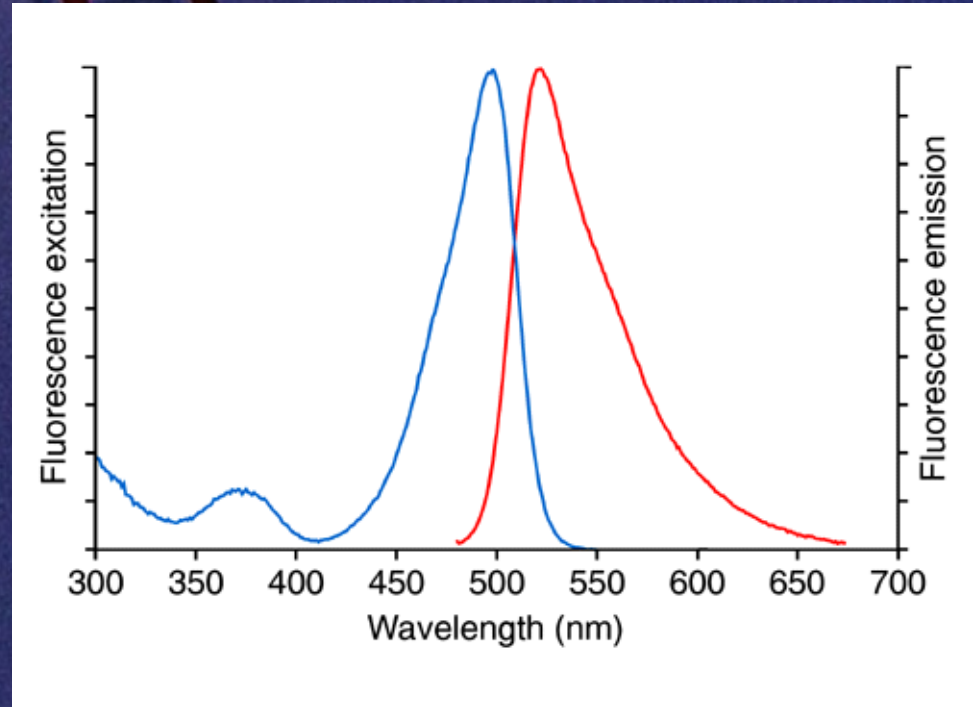
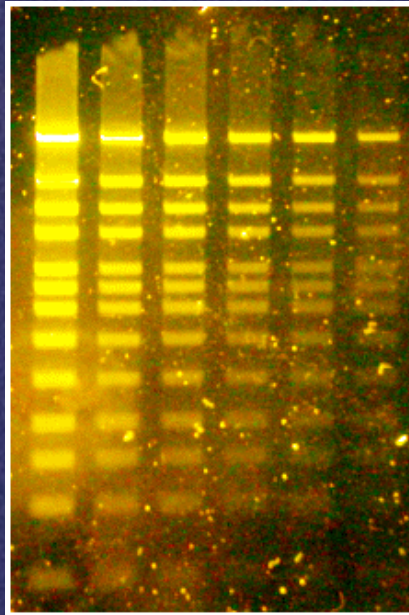


Asymetrická kyaninová barviva - SYBR Green a SYBR Gold

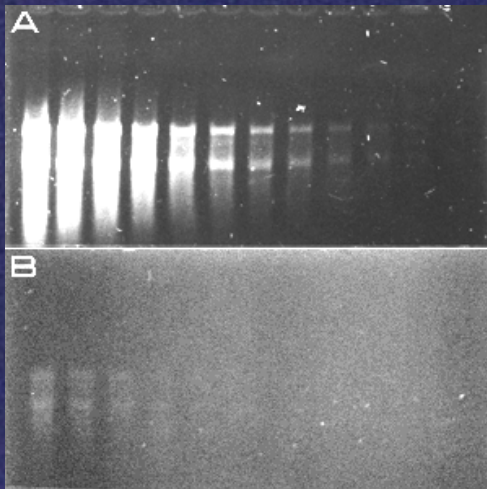
SYBR Green I



SYBR Gold



SYBR



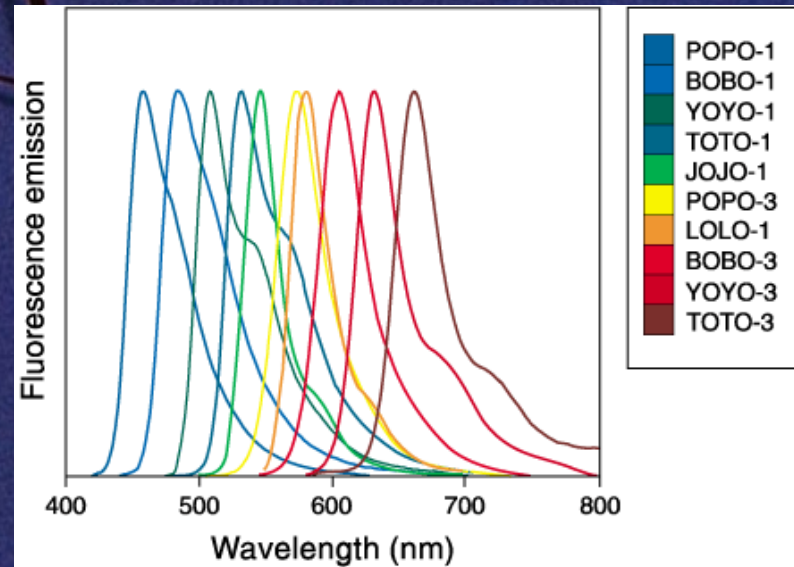
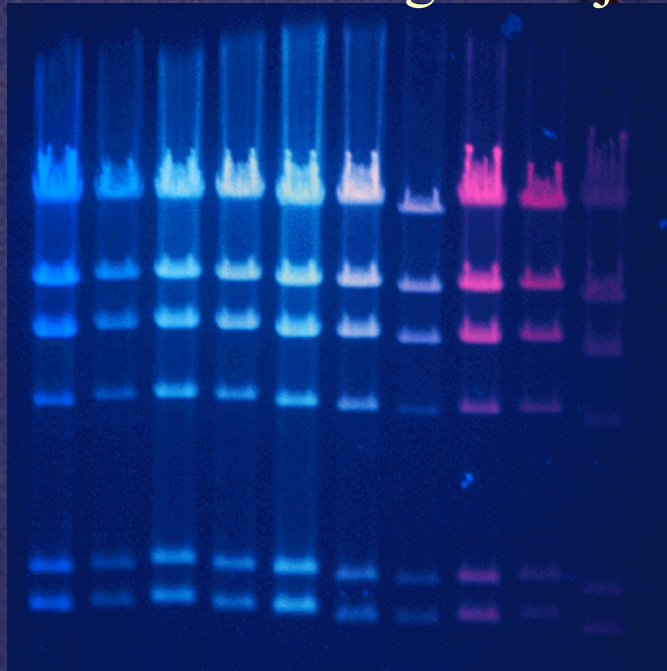
EtBr

- 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

Dimerní kyaninová barviva s vysokou afinitou k NA

a b c d e f g h i j

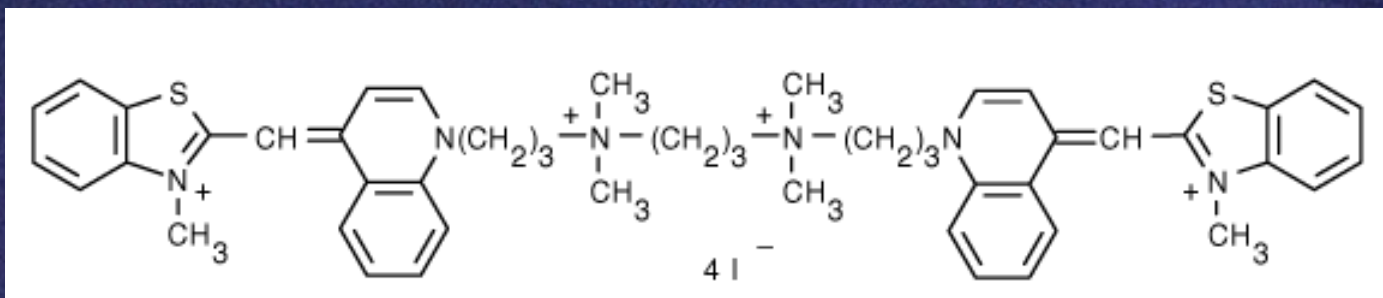
- a. POPO-1
- b. BOBO-1
- c. YOYO-1
- d. TOTO-1
- e. JOJO-1
- f. POPO-3
- g. LOLO-1
- h. BOBO-3
- i. YOYO-3
- j. TOTO-3



Citlivost 15 – 50 pg dsDNA (300 nm)

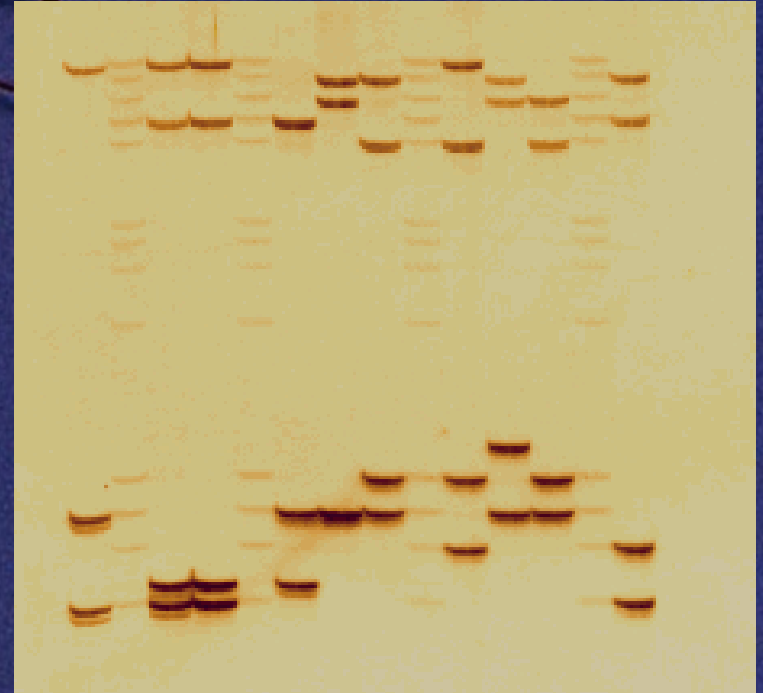
TOTO-1

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



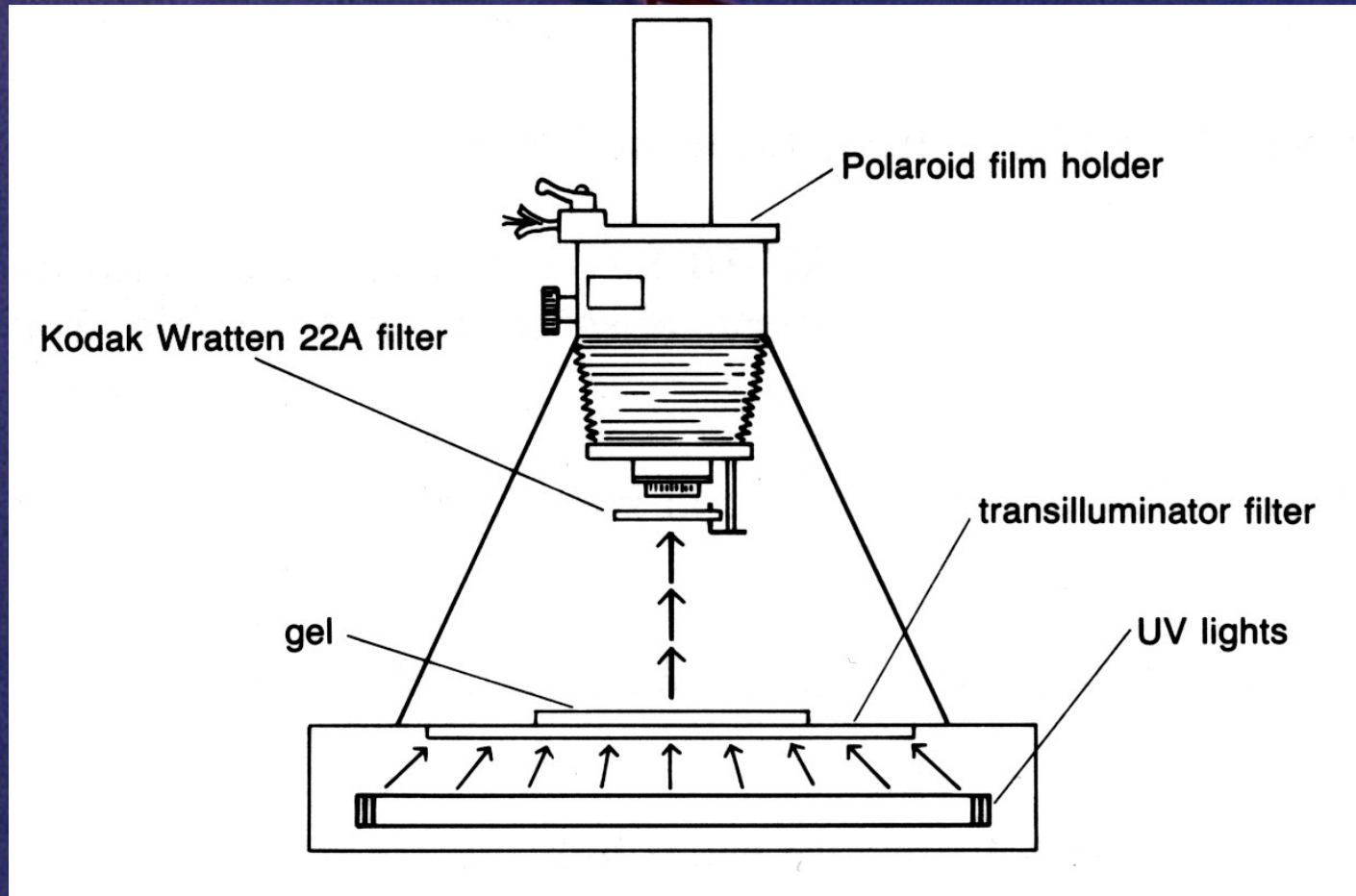
Barvení stříbrem

- 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



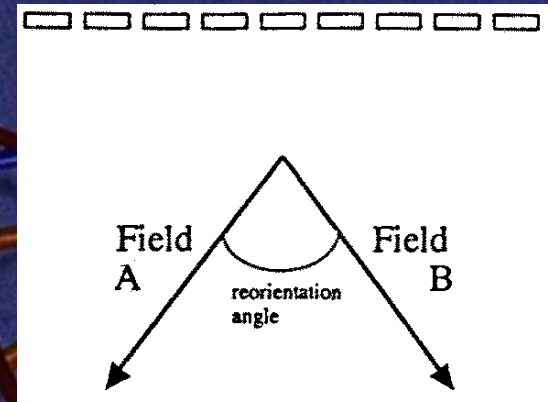
Pulzní gelová elektroforéza



- 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.

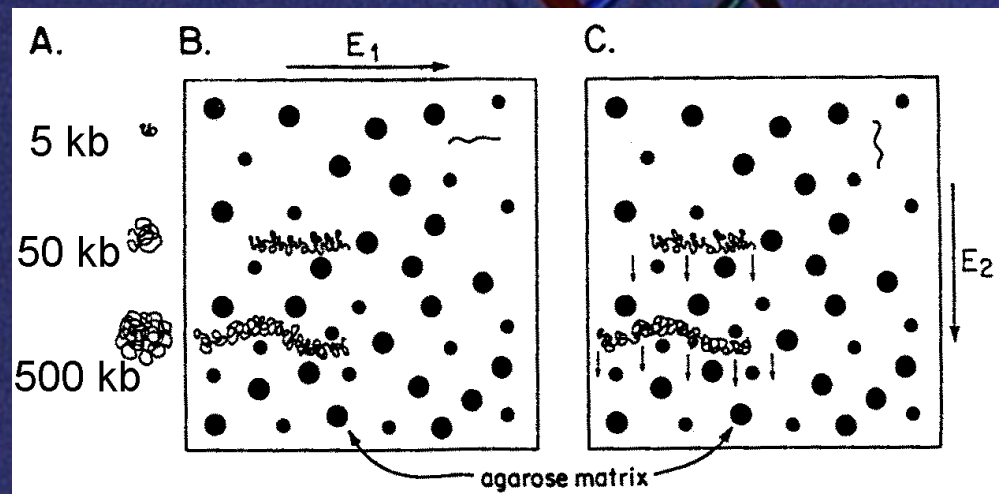
Základní termíny týkající se PFGE

- **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.

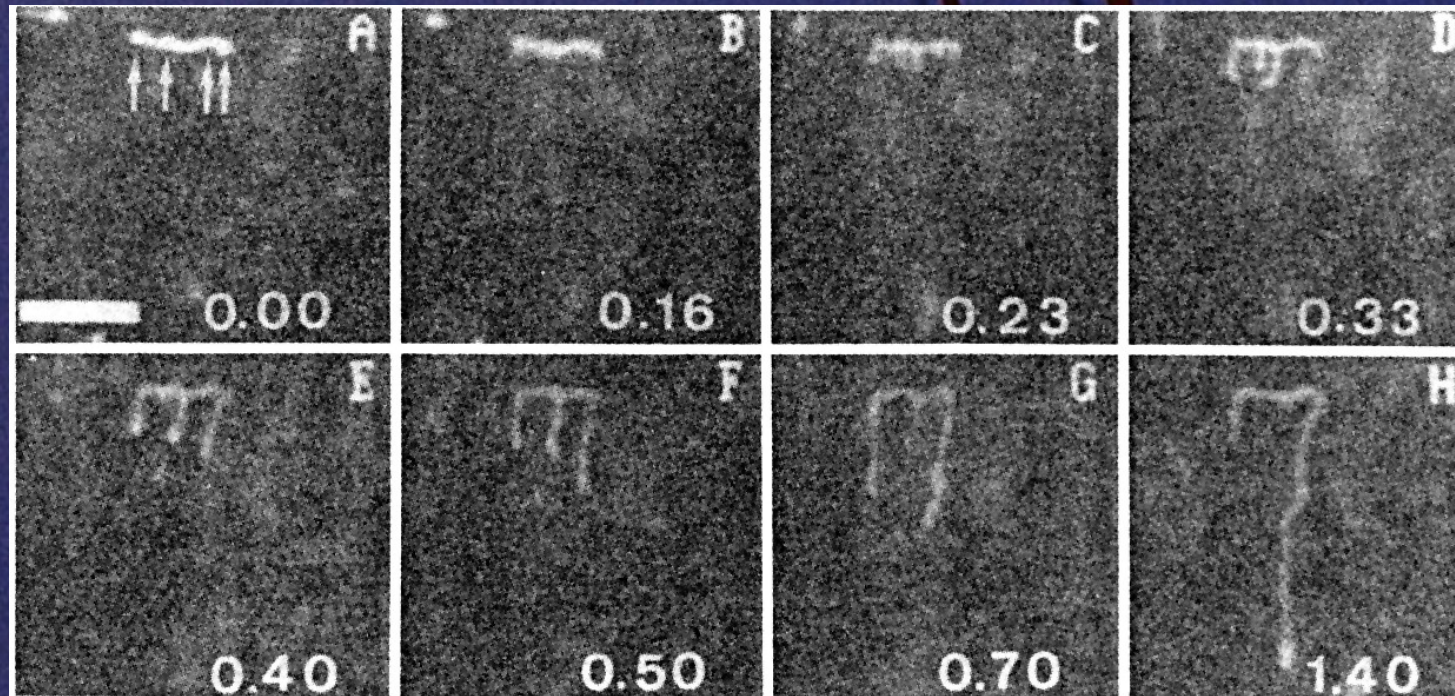


Princip separace molekul v pulzním poli

- 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.



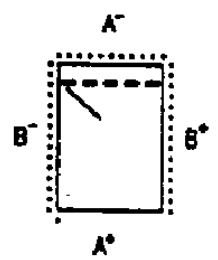
Pohyb DNA v agarózovém gelu při PFGE



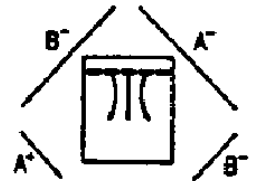
Označení systémů používaných pro pulzní elektroforézu

- **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

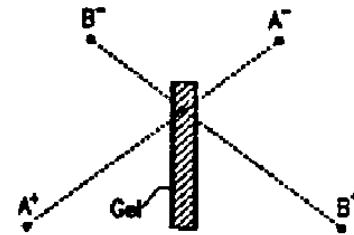
PFGE



OFAGE



TAFE



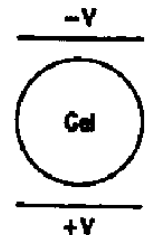
FIGE



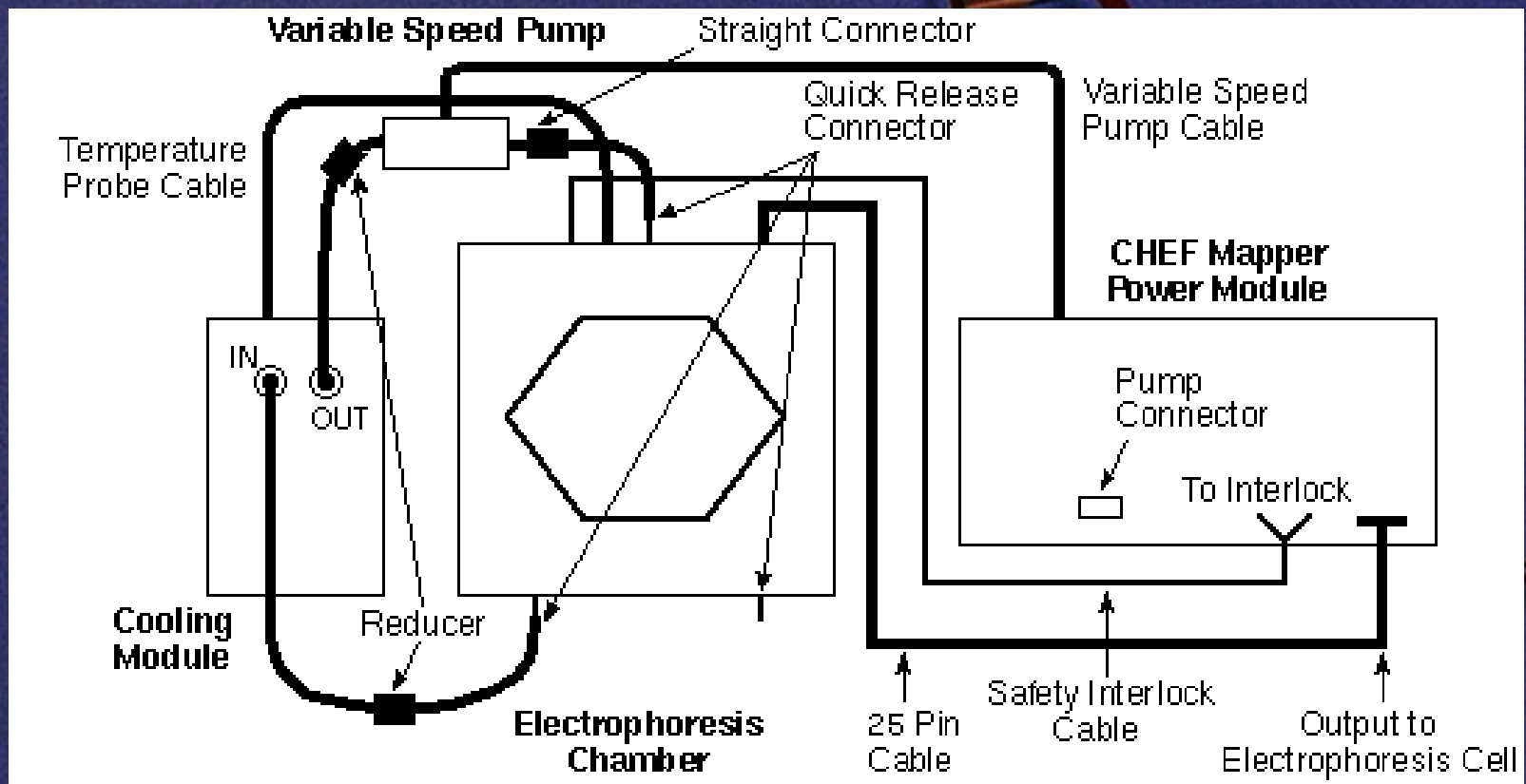
CHEF



RGE



Součásti aparatury pro 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)

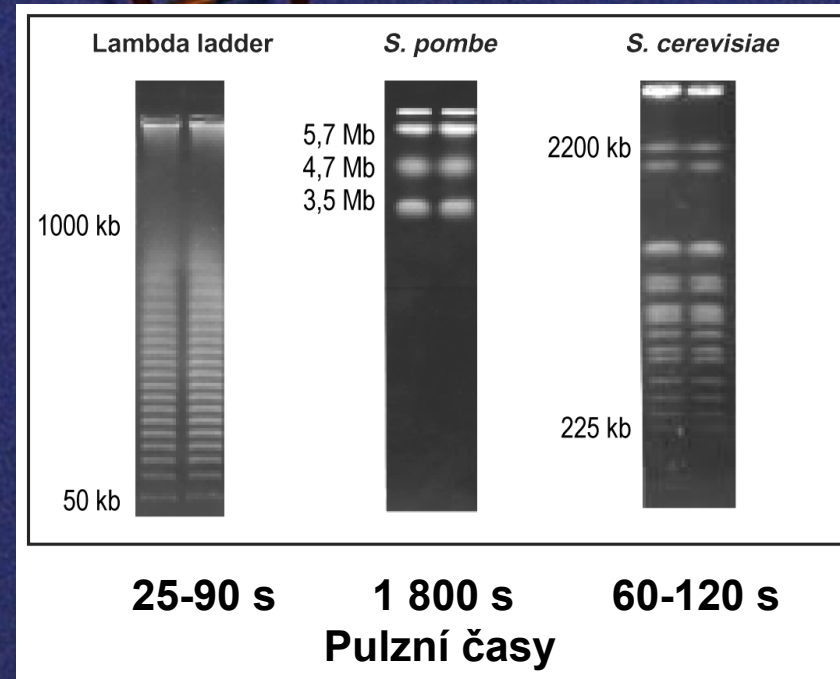
- *Schizosaccharomyces pombe*
(3,5-5,7 Mb)

- *Hansenula wingei* (1,0-3,1 Mb)

- *Candida albicans* (1,0-4,0 Mb)

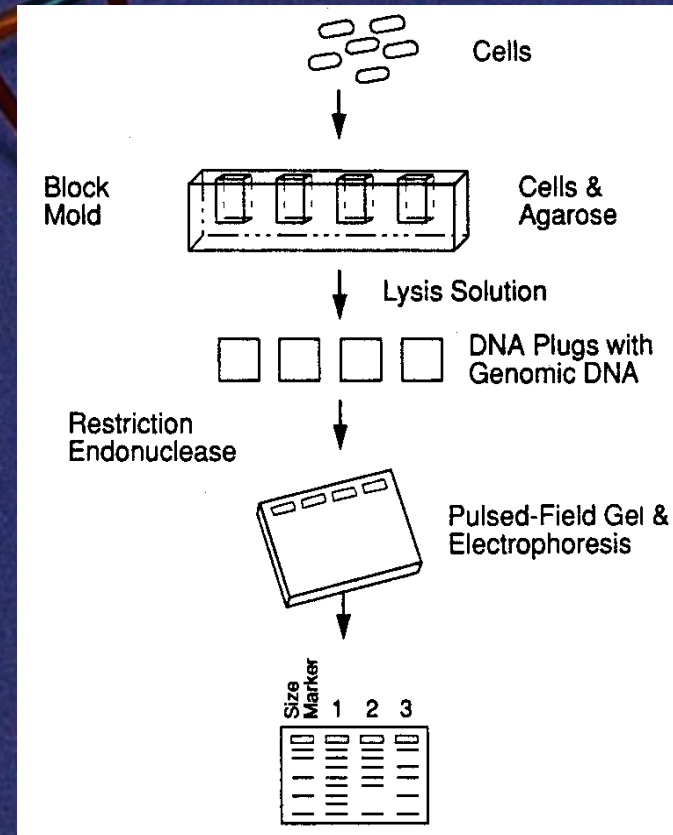
- Chromozomy *Dictyostelium discodium* (3,6-9,0 Mb)

- Chromozomy *Neurospora crassa* (4,0-10,3 Mb)



Příprava vzorků pro PFGE

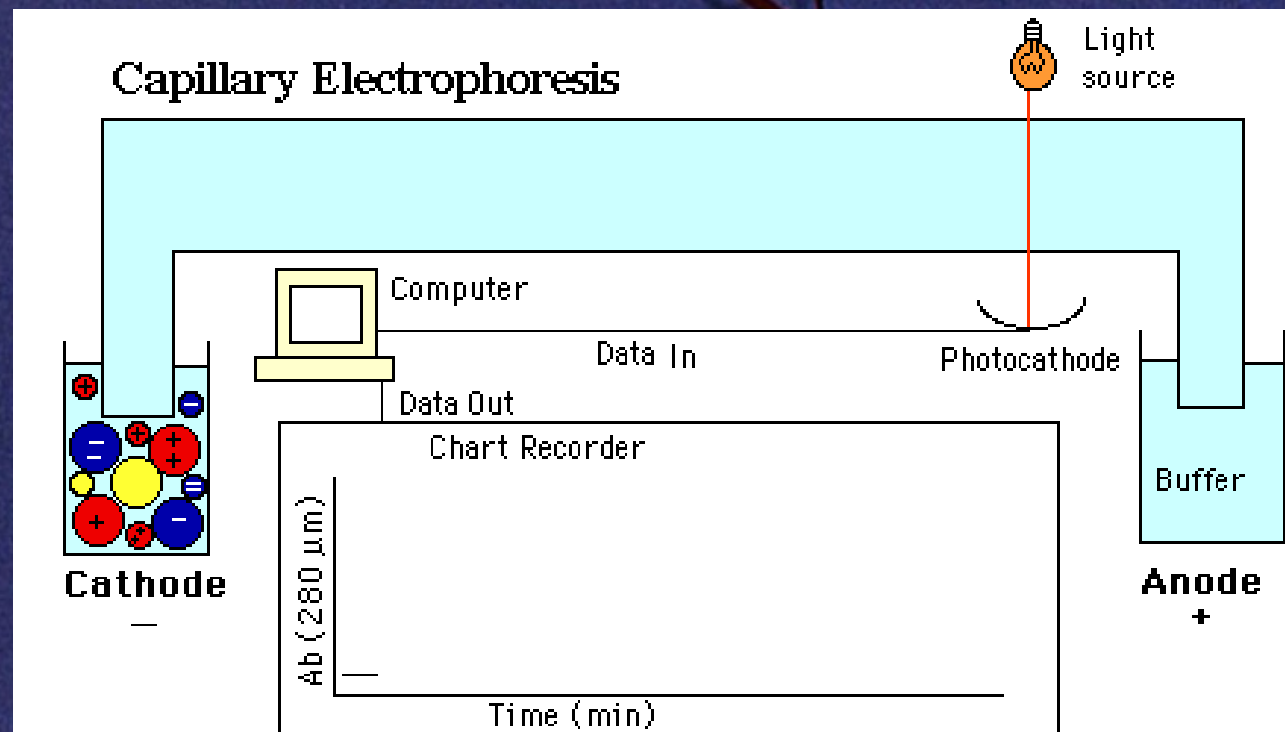
- Kultivace buněk do přesně stanovené hustoty
- Smíchání buněk s roztavenou agarózou
- Nalítí směsi do malé formičky
- lyze buněk v agarózových bločcích
- deproteinace DNA
- Štěpení restriční endonukleázou, která štěpí s nízkou frekvencí (velikost fragmentů 50 - 10 000 kbp)
- Pulzní elektroforéza
- Barvení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



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**