

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

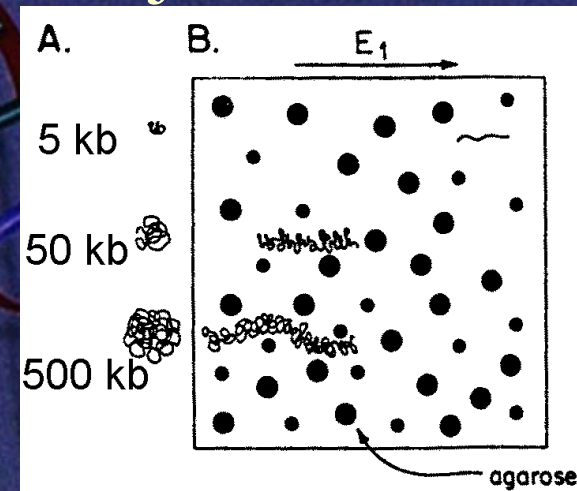
- **Výhody**

- 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



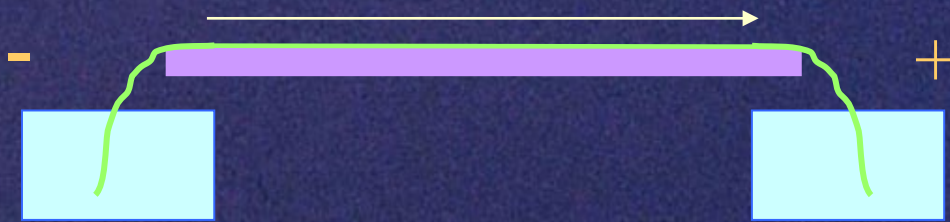
- Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny
 - agarózou
 - polyakrylamidem
- Vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry
- Velikost pórů lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru
- **Optimální velikost separovaných molekul**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





Uspořádání gelové elektroforézy

- Horizontální

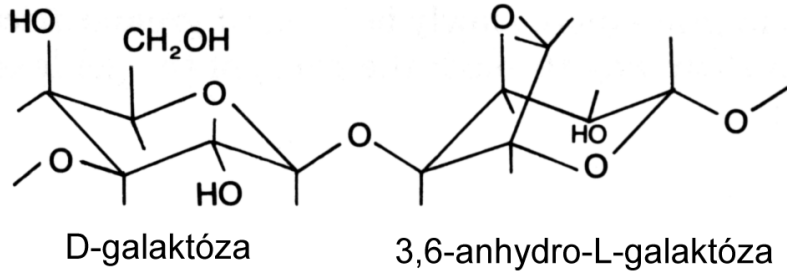


- Vertikální



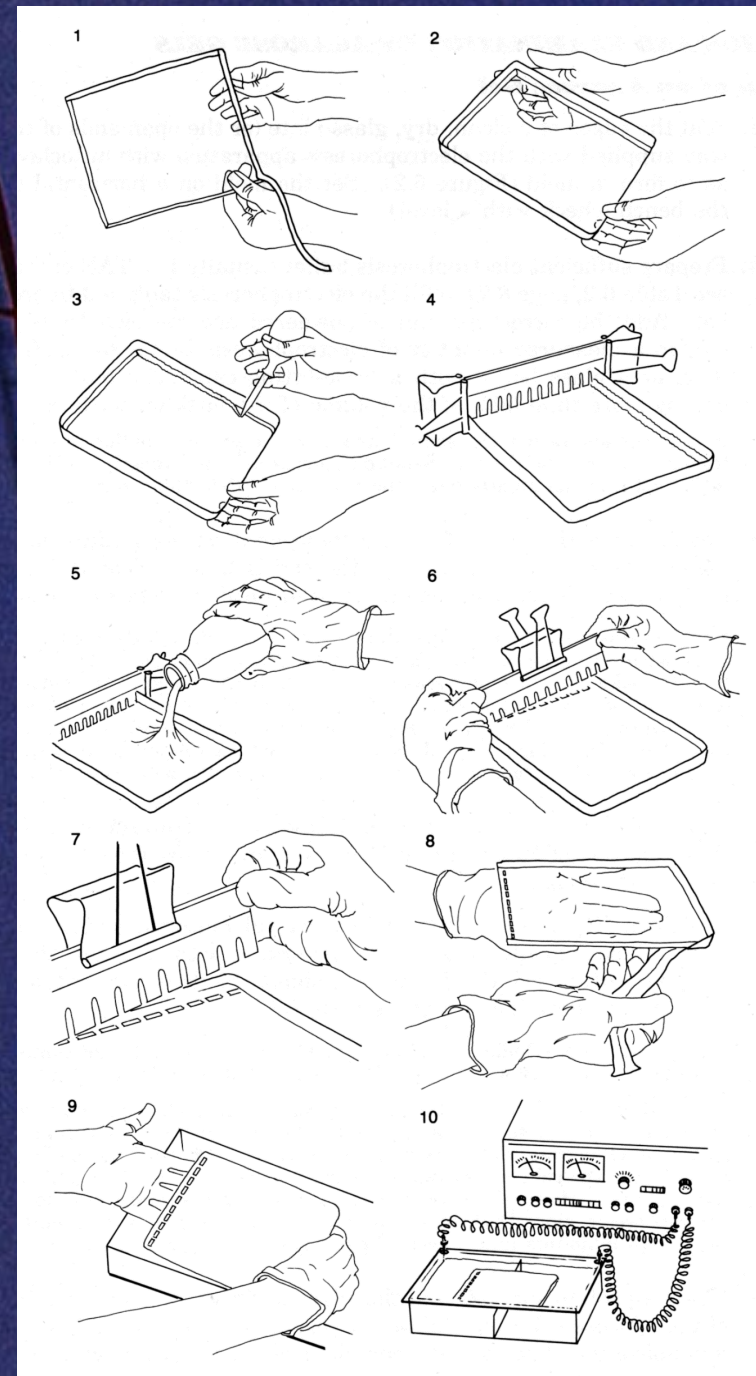
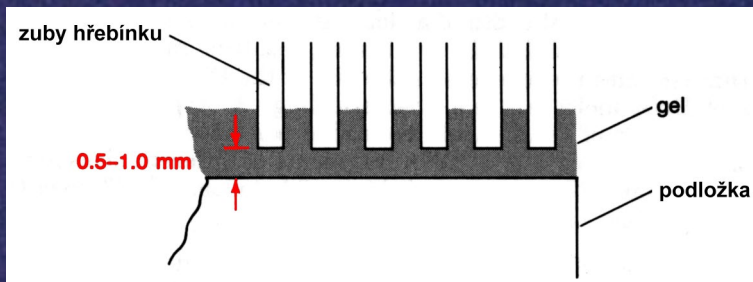
- Kapilární

Agaróзовé gely

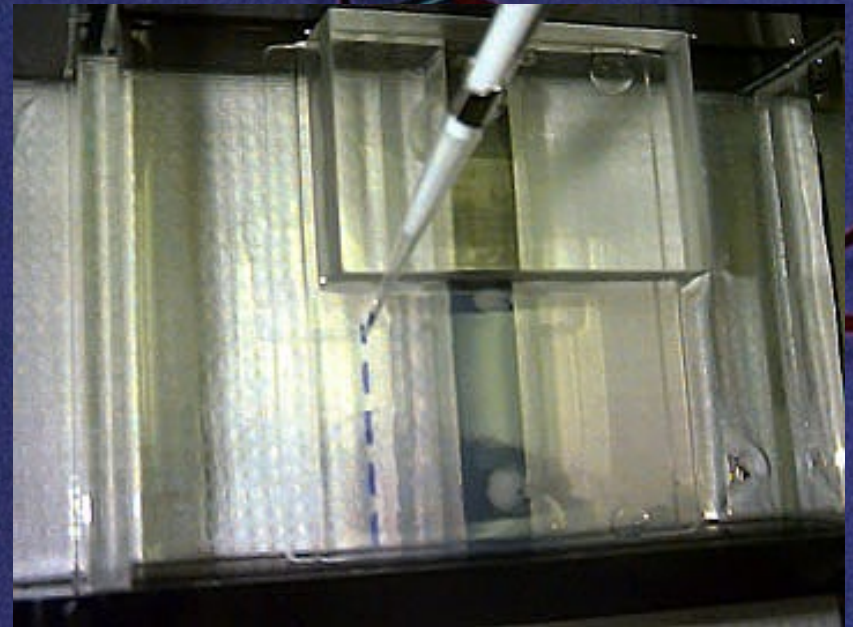
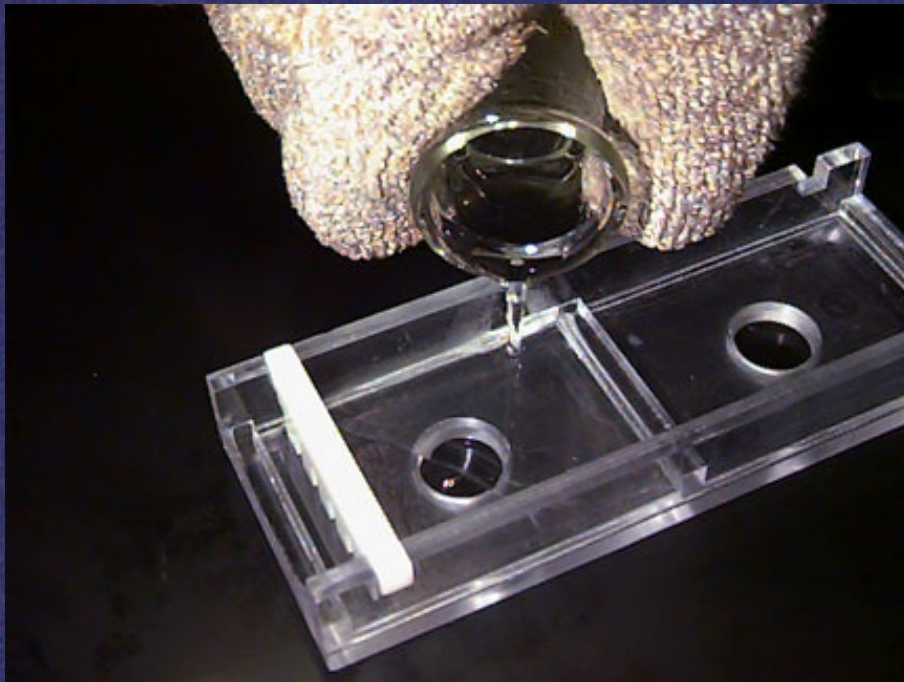
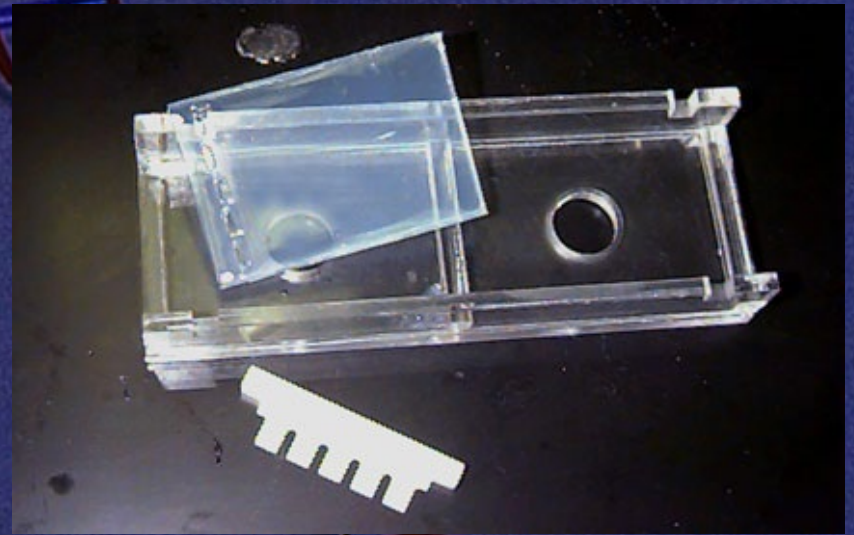
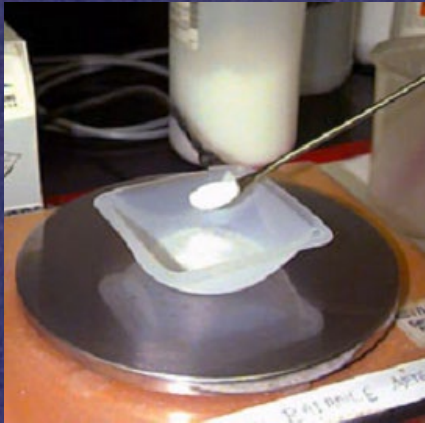


Separáčnı schopnosti gelu v závislosti na koncentraci agarózy

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



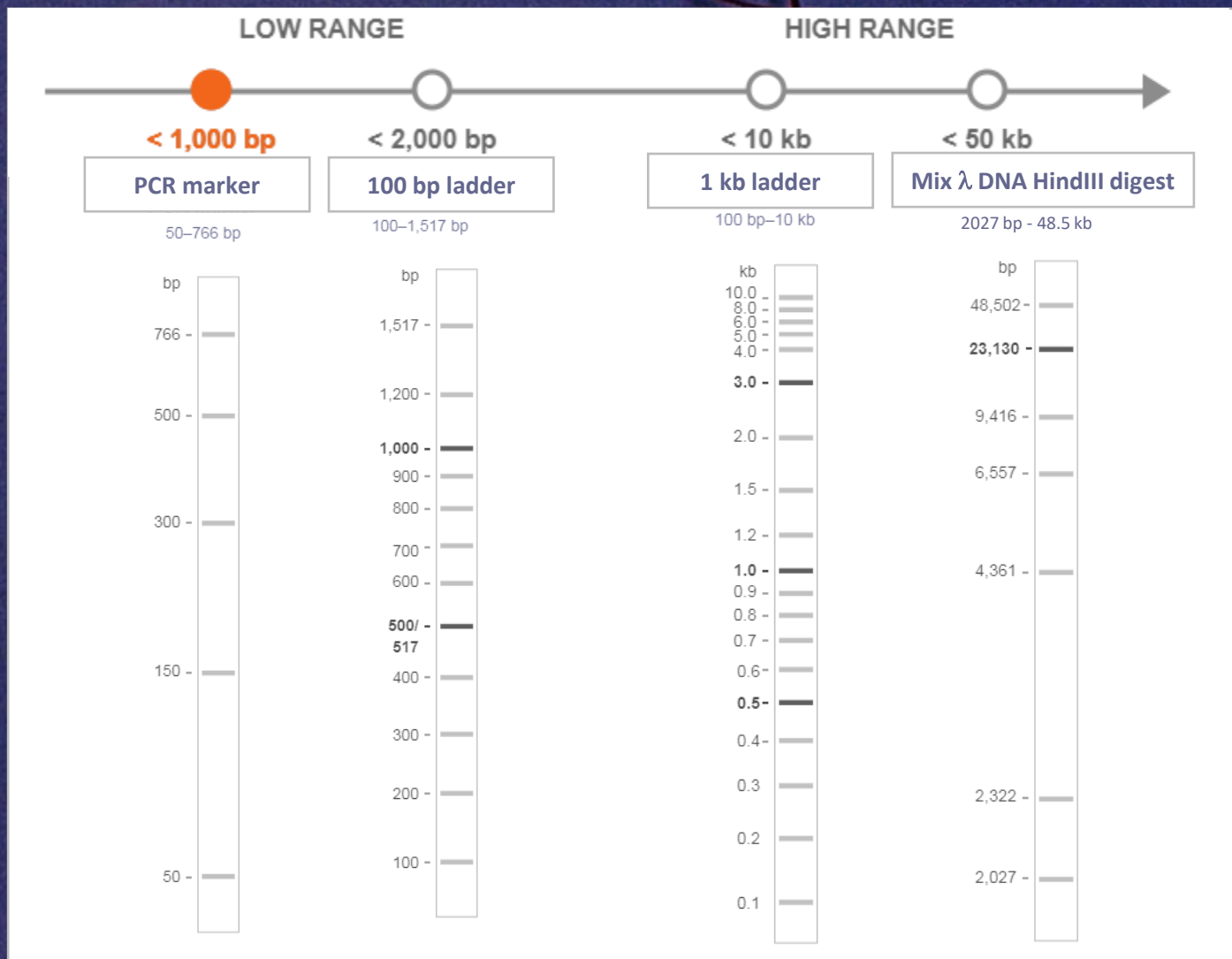
Příprava agaróзовého gelu



Aparatura pro horizontální elektroforézu



Příklady hmotnostních markerů

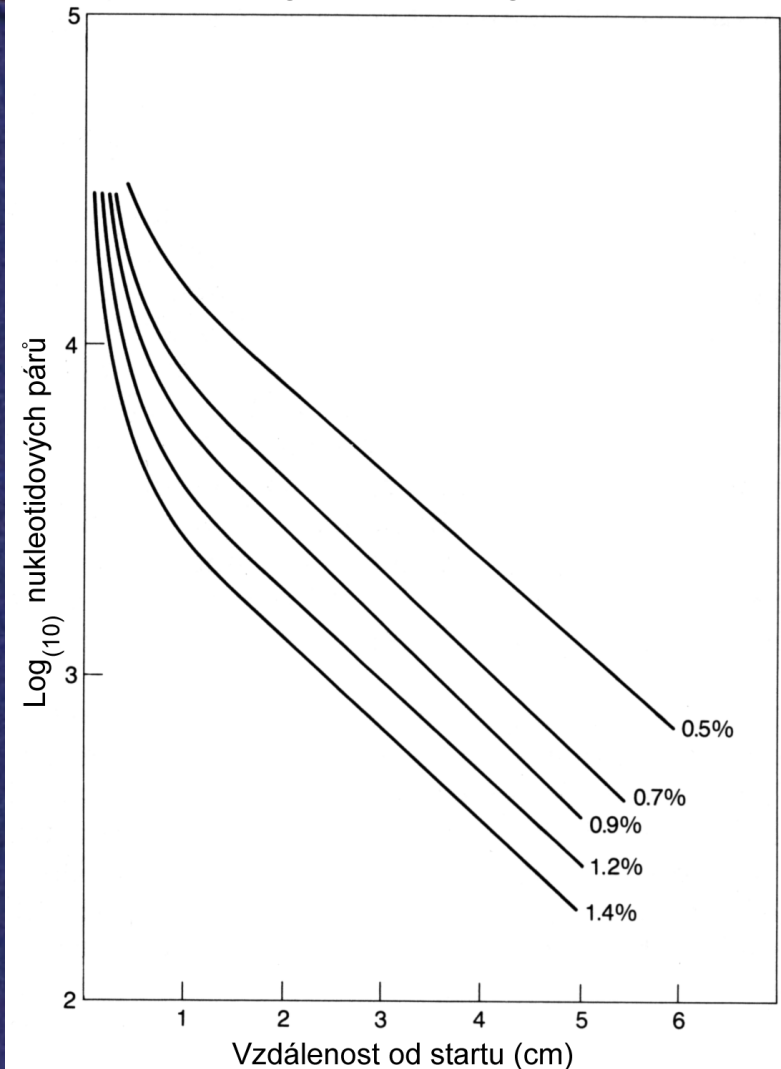


Elektroforetická pohyblivost DNA



- 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



Speciální typy agaróz

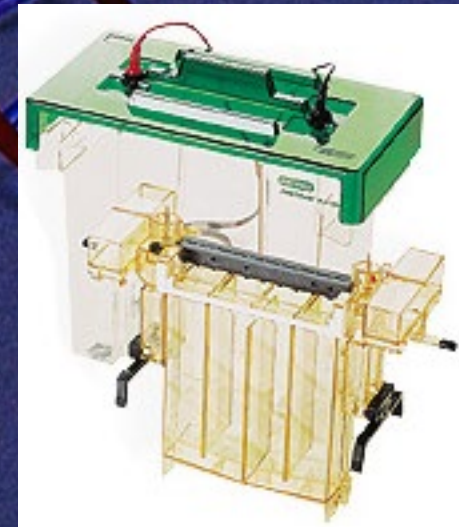
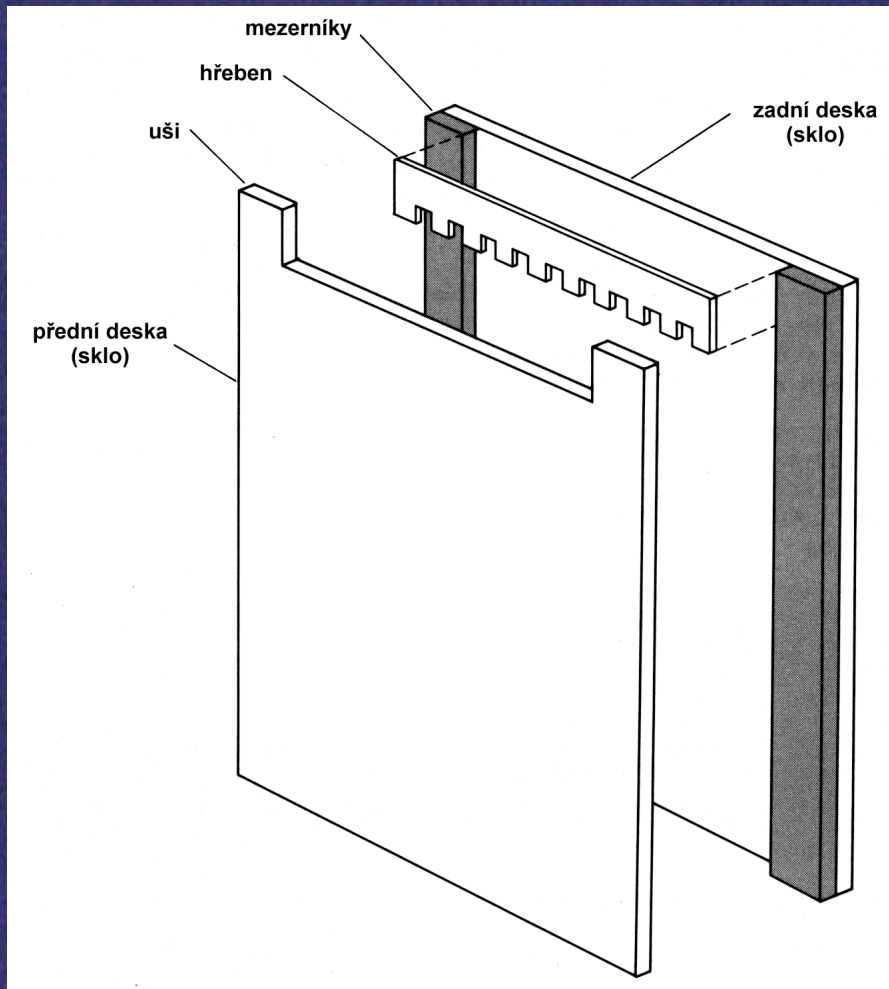
- Některé agarózy nejsou zcela čisté; jsou kontaminovány dalšími polysacharidy, solemi a nejsou vhodné pro elektroforézu.
- Přídavné látky mohou ovlivnit jak rychlost migrace DNA v gelu, tak použitelnost DNA vyizolované z gelu.
- Řada výrobců připravuje speciální typy agaróz pro speciální účel
 - Agarózy s nízkým bodem tání/tuhnutí (LMT) pro preparativní účely
 - Agarózy s vysokou rozlišovací schopností pro analýzu velmi malých fragmentů (10 – 500 bp). Používané koncentrace jsou 4-10 %.
 - Preparativní agarózy

Alkalická agarózová elektroforéza


- Pro analýzu ssDNA nebo RNA
 - Analýza velikostí cDNA
 - Analýza S1 nukleáza rezistentních DNA:RNA hybridů
 - Srovnání velikostí prvního a druhého řetězce cDNA syntetizovaného zpětnou transkriptázou
 - Kontrola aktivity enzymů vytvářejících jednořetězcové zlomy
- Alkalické pufry obsahují 50 mM NaOH. Za přítomnosti NaOH se agaróza nerozvaří, proto musí být NaOH přidáván až po rozvaření.
- Detekce pomocí ^{32}P značených konců

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

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

Gely pro Sangerovo sekvenování

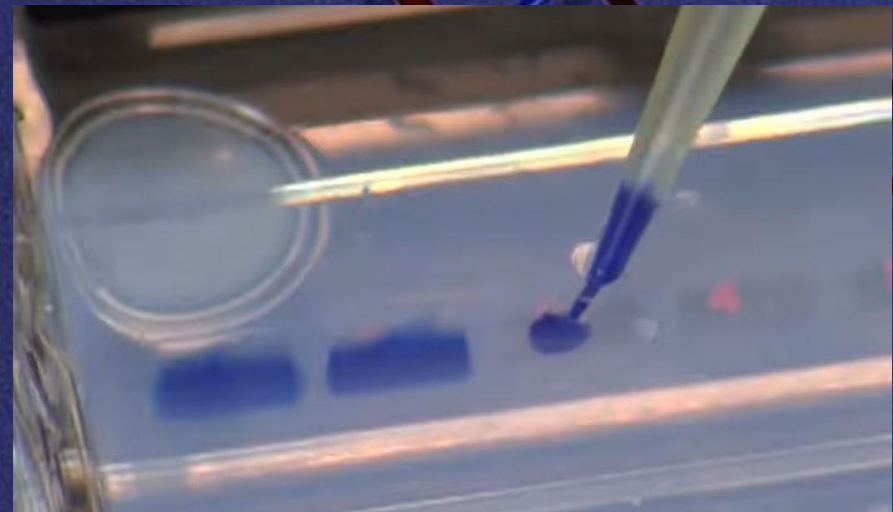


- Výsledkem reakcí používaných při sekvenování DNA jsou jednořetězcové oligonukleotidy o délce desítek až stovek bází.
- Lze je účinně oddělit na **denaturujících polyakrylamidových gelech**.
- Podmínky elektroforézy musí být takové, aby se během separace zabránilo vytváření lokálních dvouřetězcových struktur.
- Používají se gely s vysokou koncentrací denaturujících látek (např. močoviny).
- Vlastní elektroforéza probíhá při vysokém napětí.
- To má za následek, že se gel zahřeje na 50-70 °C.
- Kombinace těchto dvou faktorů zaručuje úplnou denaturaci jednořetězců.

Pufry pro nanášení vzorků



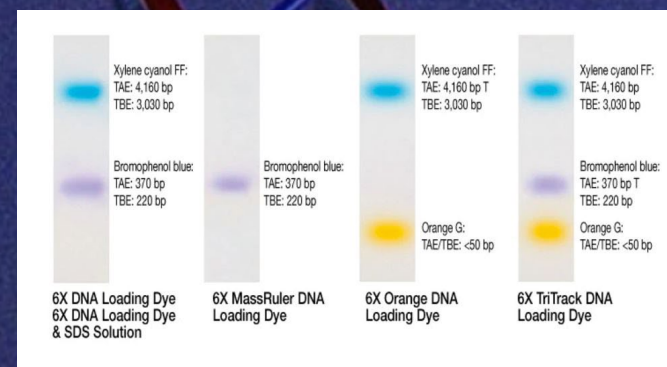
- Nanášecí pufry slouží při elektroforéze NA
 - Zvýšení hustoty vzorku - to umožní, že DNA klesne na dno jamky
 - Obarvení vzorku pro snadnější nanášení
 - Přidání pohyblivého barviva do vzorku pro možnost sledování průběhu elektroforézy
- Rozdělení nanášecích pufků
 - Založené na sacharóze
 - Založené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

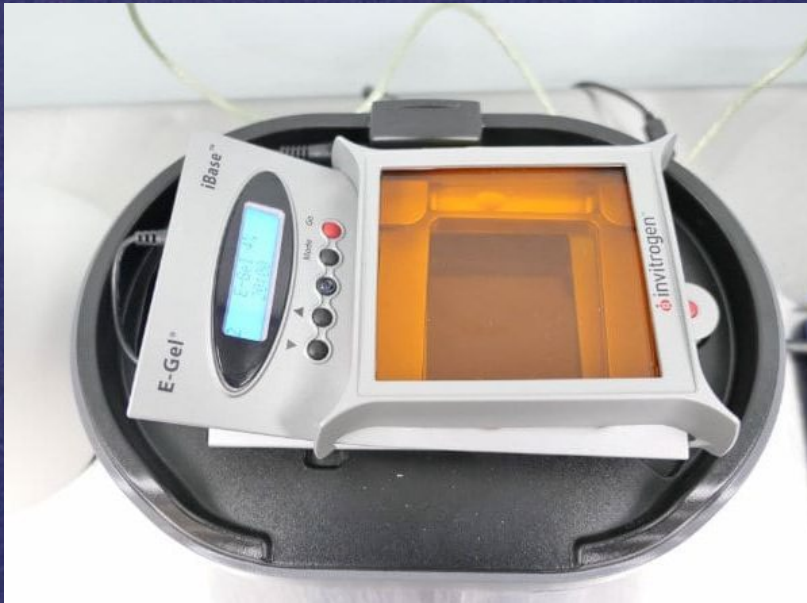


Používané elektroforetické pufry

Pufr	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×

Předem připravené gely (precast gels)

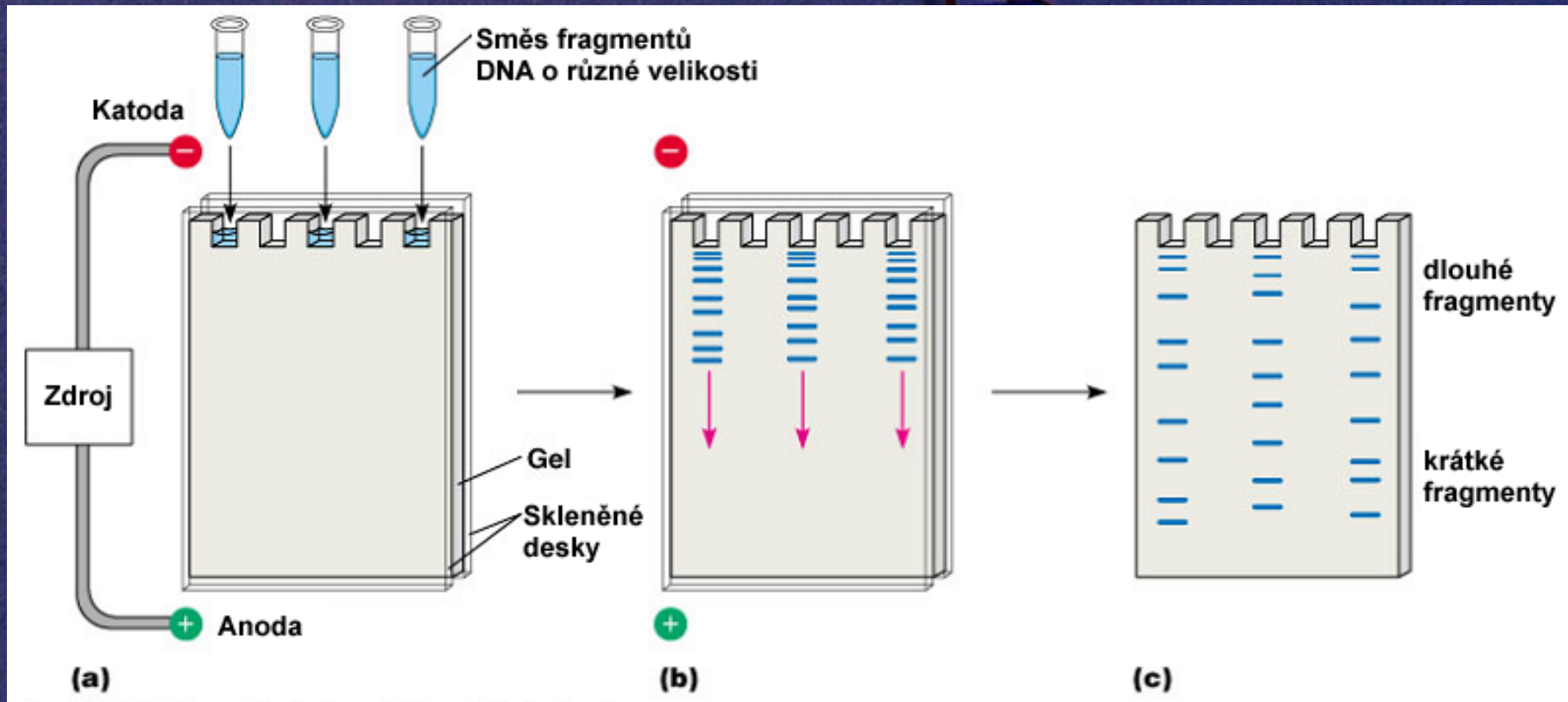
kompaktní stolní přístroje,
které mají integrovanou
elektroforézu



Bioanalyzátor (Agilent)
pro elektroforézu DNA,
RNA i proteinů



Provedení elektroforézy



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

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

1. Molekulová velikost DNA (délka)

- Molekuly lineární dsDNA se pohybují rychlostí, která je nepřímo úměrná logaritmu (\log_{10}) jejich velikosti - počtu párů bazí) $v = \frac{1}{\log M}$
- Molekuly se pohybují ve tvaru závitů přímočaře a plynule od katody k anodě
- Efekt molekulárního síta – větší molekuly migrují mnohem pomaleji vzhledem k většímu třecímu zbrždění

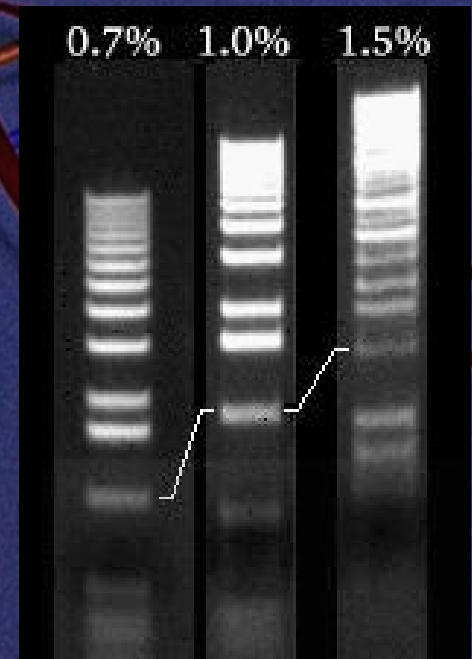
Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

2. Koncentrace gelu

- Lineární DNA fragmenty dané velikosti migrují různou rychlostí gely obsahujícími různou koncentrací gelu. Platí lineární vztah mezi logaritmem elektroforetické mobility DNA (m) a koncentrací gelu (t):

$$\log m = \log m_0 - K_r t,$$

kde m_0 je volná elektroforetická mobilita DNA a K_r je retardační koeficient, konstanta, která souvisí s vlastnostmi gelu a velikostí a tvarem migrujících molekul. Viz též tab. koncentrací.



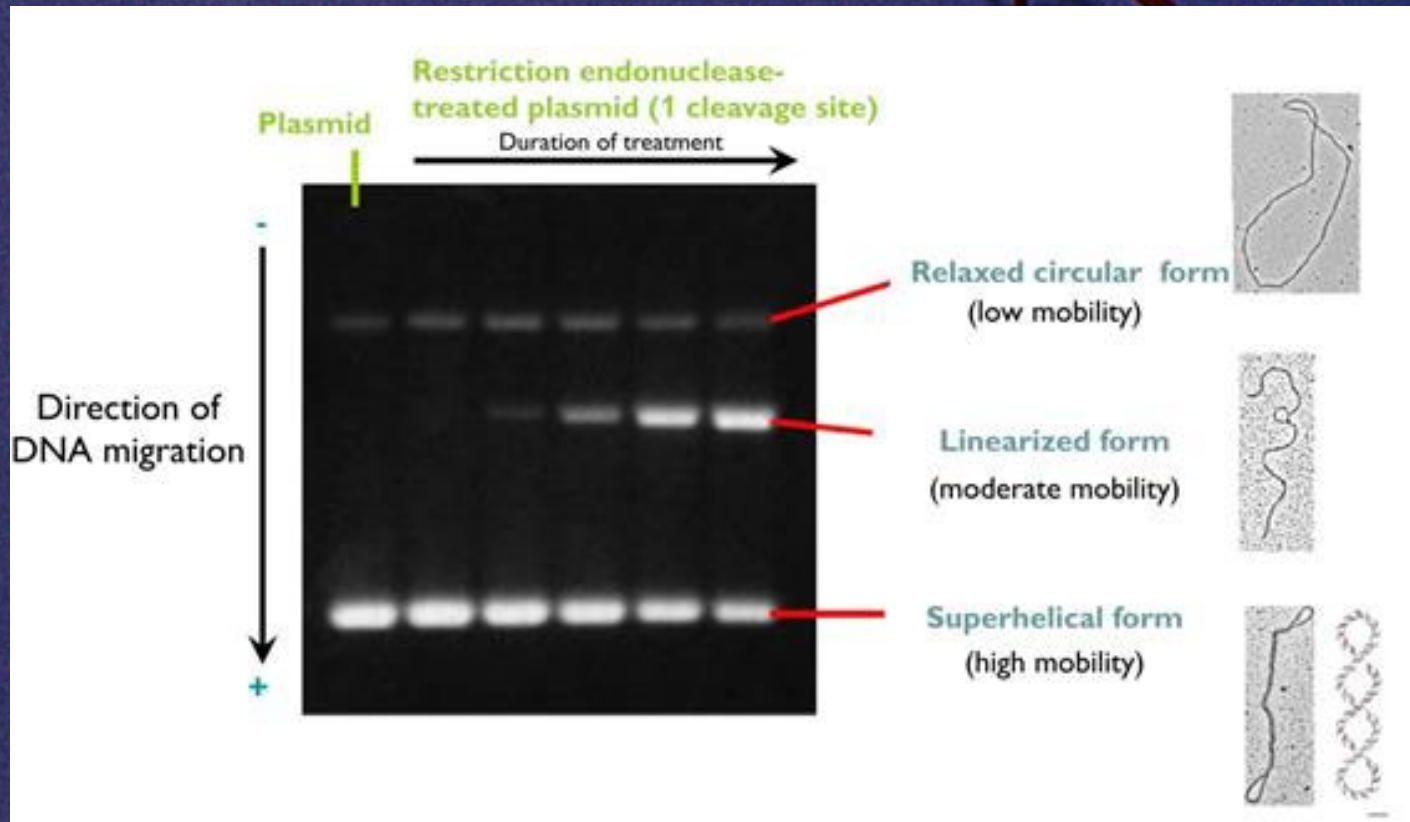
Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

3. Konformace DNA

- Superhelikální forma (forma I), otevřená kružnicová forma (forma II) a lineární forma (forma III) DNA téže velikosti migrují agarózovým gelem různou rychlostí.
- Relativní mobilita těchto tří forem závisí především na koncentraci agarozy v gelu, ale je ovlivněna rovněž silou aplikovaného proudu, iontovou silou pufru a hustotou superhelikálních otáček u formy I.
- Za určitých podmínek migruje forma I rychleji než forma III; za jiných podmínek je tomu naopak. Forma II je vždy nejpomalejší.
- Jednoznačnou metodou pro identifikaci různých konformačních forem je provedení elektroforézy za přítomnosti zvyšující se koncentrace EtBr.
 - Odstraňují se negativní superhelikální otáčky v DNA, zvětšuje se průměr molekuly a rychlost pohybu se snižuje
 - Při kritické koncentraci barviva ($0,1 - 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) již žádné superhelikální otáčky nejsou a DNA dosahuje nejnižší migrační rychlosti



Elektroforetická mobilita plazmidů

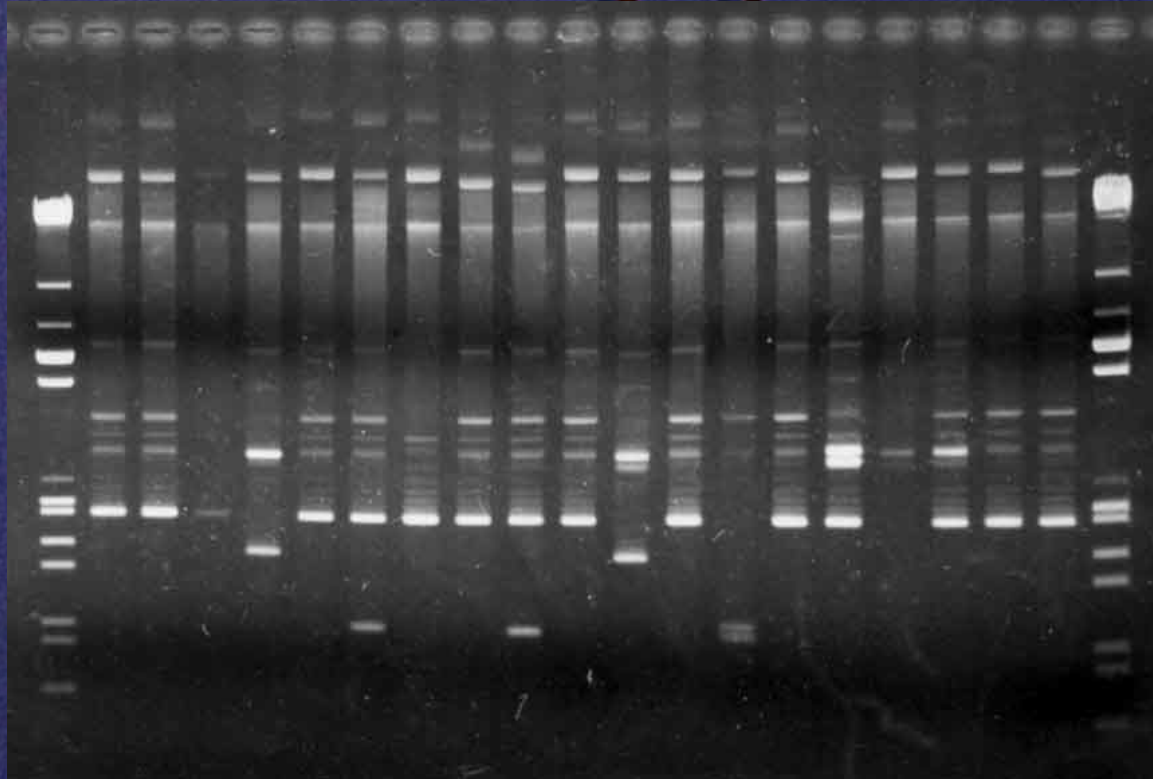


Forma II

Forma III

Forma I

- Příklad analýzy plazmidů u *Staphylococcus aureus* z epidemie na JIP v Olomoucké nemocnici.



- V současné době se plazmidová analýza používá jako doplňková typizační metoda u gramnegativních (*Salmonella*, *Neisseria*, *Escherichia*) i grampozitivních (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Helicobacter*) bakterií.

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

4. Aplikované napětí (V/cm)

- Při nízké voltáži je rychlost migrace lineární DNA proporcionalní aplikované voltáži.
- Se zvyšující se silou elektrického pole se rychlost migrace fragmentů zvyšuje rozdílně a efektivní rozsah separace v agarozovém gelu je snížen.
- Pro maximálního rozlišení DNA fragmentů větších než 2 kb je horní hranice 5 V/cm .

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu



5. Směr elektrického pole

- DNA molekuly větší než 50 kb migrují v agarozovém gelu stejnou rychlostí ve směru konstantního elektrického pole.
- Jejich rychlosti se změní v pulzním poli při pulzní gelové elektroforéze (viz PFGE)

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

6. Složení bází a teplota

- V agarozovém gelu na rozdíl od PAGE složení bází ani teplota (v rozmezí 4 – 30 °C) neovlivňují rychlost migrace.
- Elektroforéza se obvykle provádí při pokojové teplotě
- Gely z LMT nebo o nízké koncentraci (0,3 %) se pouští při 4 °C.

7. Přítomnost interkalačních barviv

- EtBr snižuje elektroforetickou mobilitu lineárních molekul asi o 15%.
- Interkalací EtBr se prodlužuje délka molekul DNA (lineárních a OC).

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

8. Složení elektroforetických pufců

- Mobilita je ovlivněna iontovou silou a složením elektroforetického pufcu.
- Za nepřítomnosti iontů je rychlost migrace nízká nebo žádná.
- 3 základní pufry: TAE, TBE a TPE (pH okolo 7,5-7,8).

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 mnohem citlivější než barvicí metody
 - **Hybridizací se značenou sondou**

Rozdělení barviv pro detekci nukleových kyselin

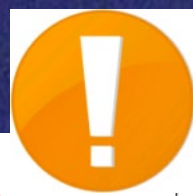
• Klasická barviva NA

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

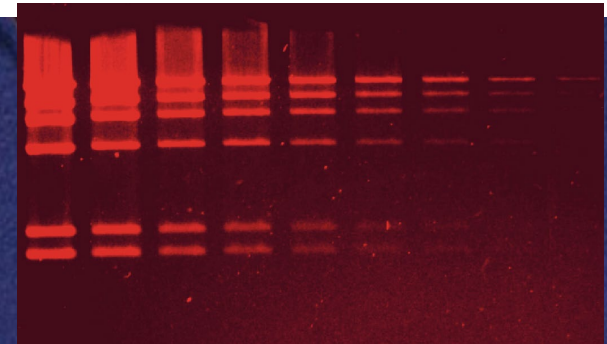
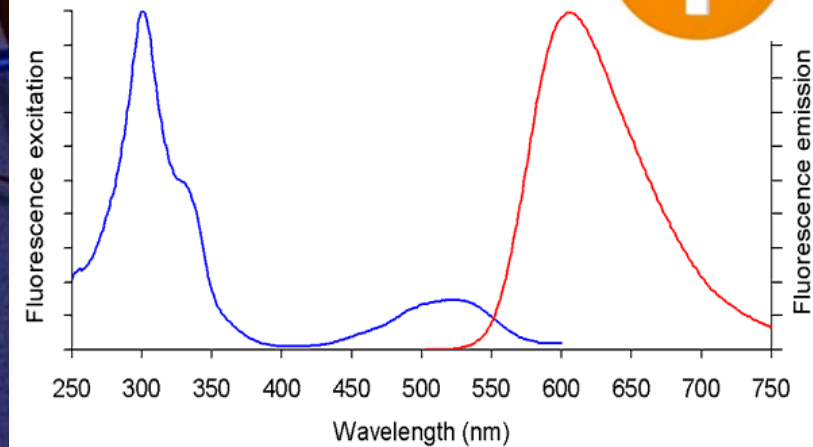
• Kyaninová barviva

- Původní patentovaná
 - **Pro barvení gelů**
 - **SYBR Gold**
 - **SYBR Green I a II**
 - **SYBR Safe, aj. deriváty**
 - **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

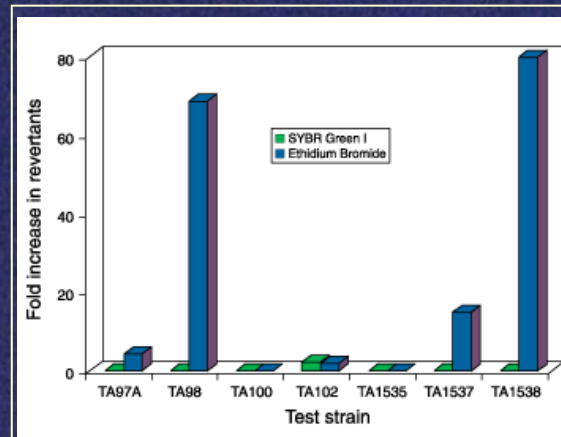
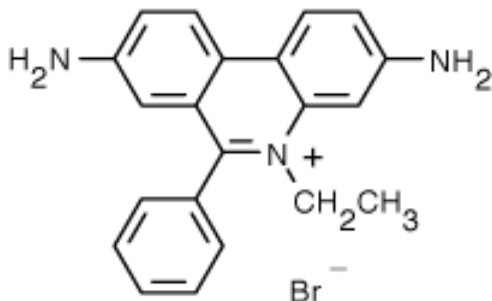
Fenantridinová barviva – Etidium bromid



- 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

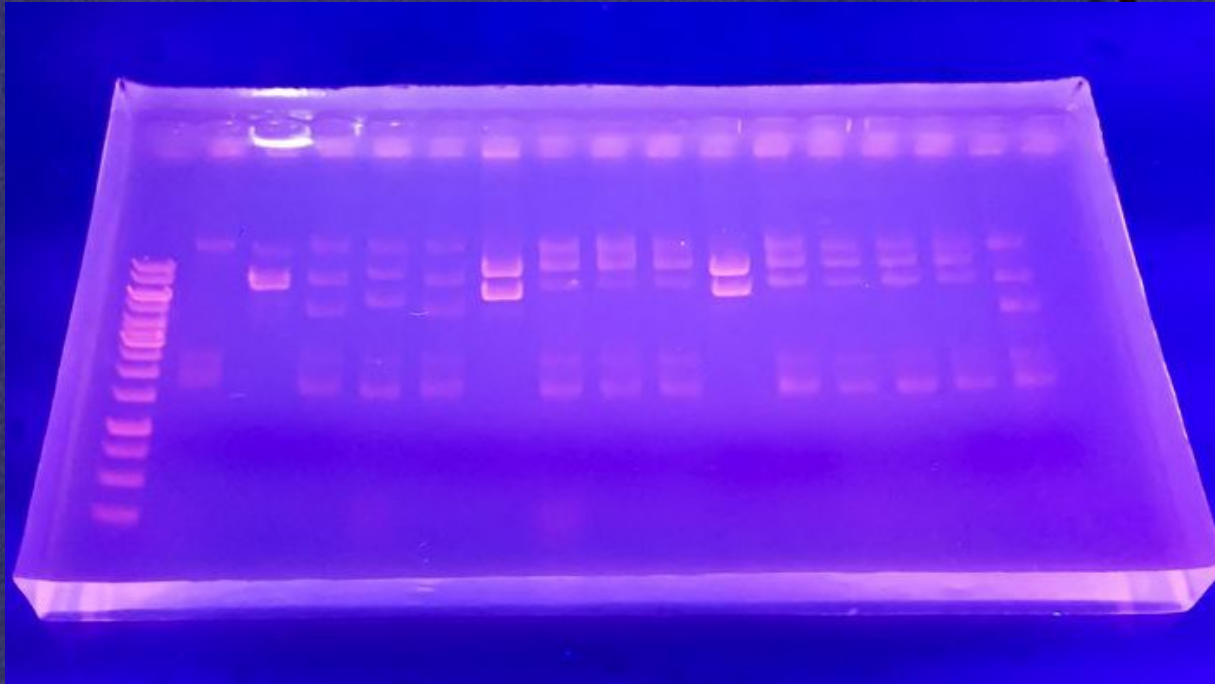


Etidium bromid (fenantridinium, 3,8-diamino-5-etyl-6-fenyl-bromid)



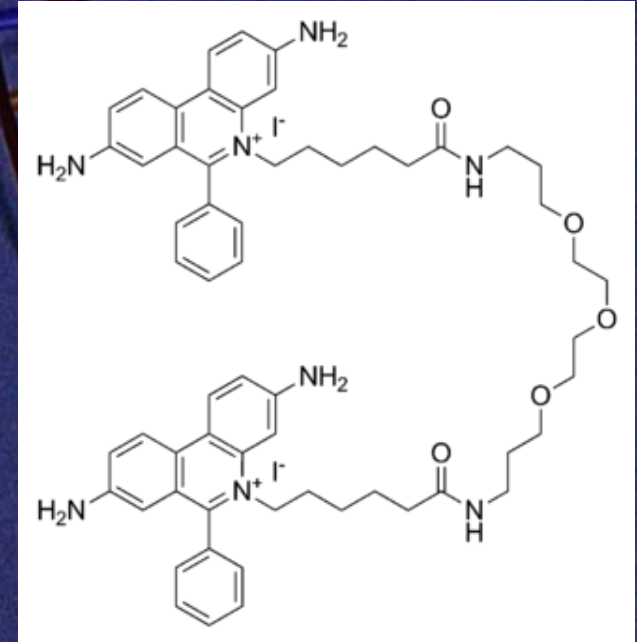
Srovnání výsledků
Amesova testu
u EtBr a SYBR

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



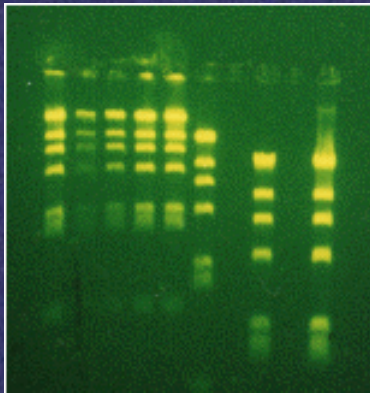
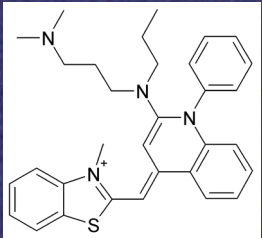
GelRed

- Interkalační barvivo pro nukleové kyseliny , které se skládá ze dvou ethidiových podjednotek přemostěných lineárním spacerem
- Vlastnosti jsou totožné s vlastnostmi ethidium bromidu
- Není schopen procházet buněčnými membránami
- Látka je uváděna na trh jako méně toxická a citlivější alternativa ethidium bromidu

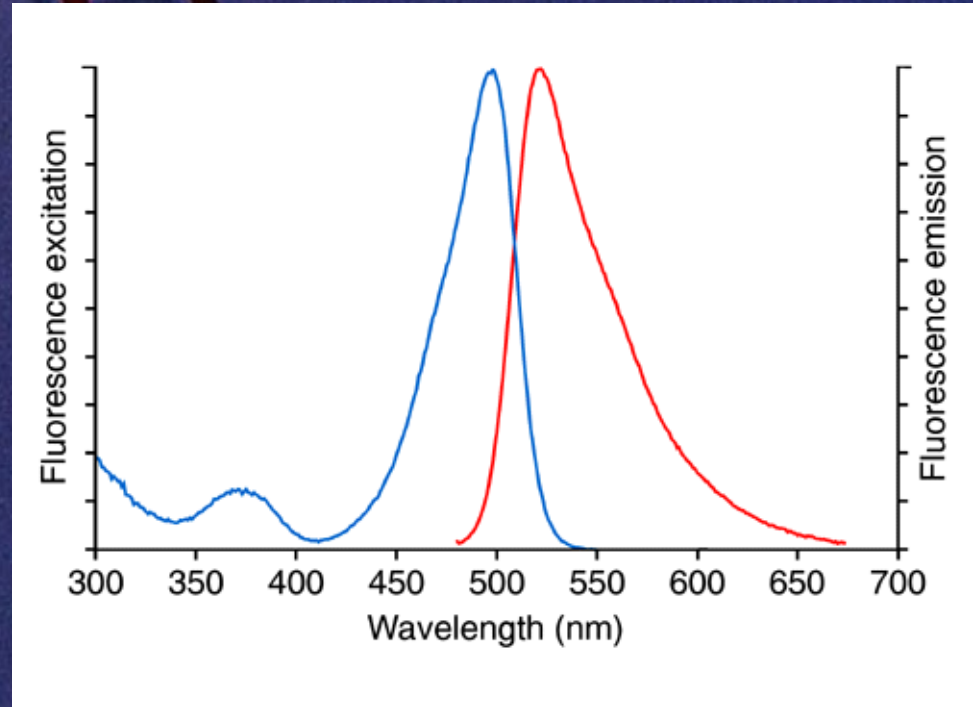
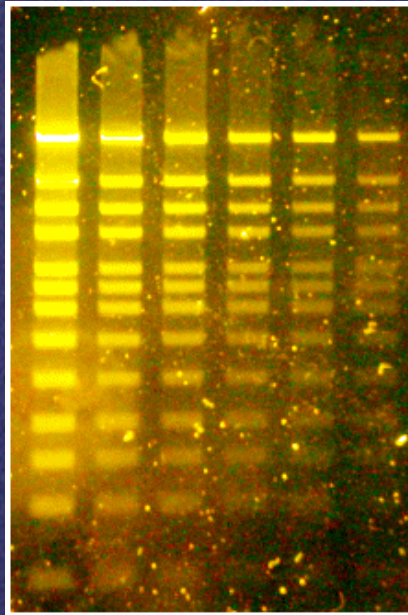


Asymetrická kyaninová barviva - SYBR Green a SYBR Gold

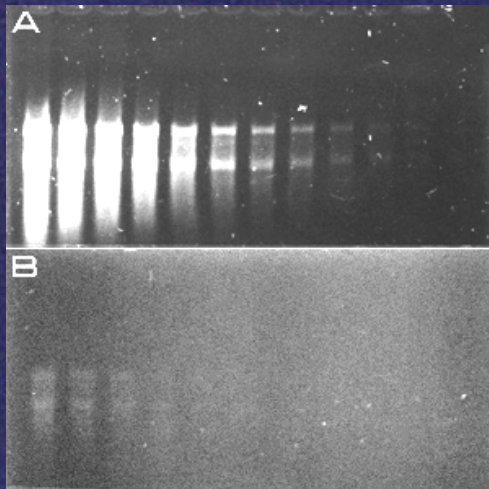
SYBR Green I



SYBR Gold



SYBR



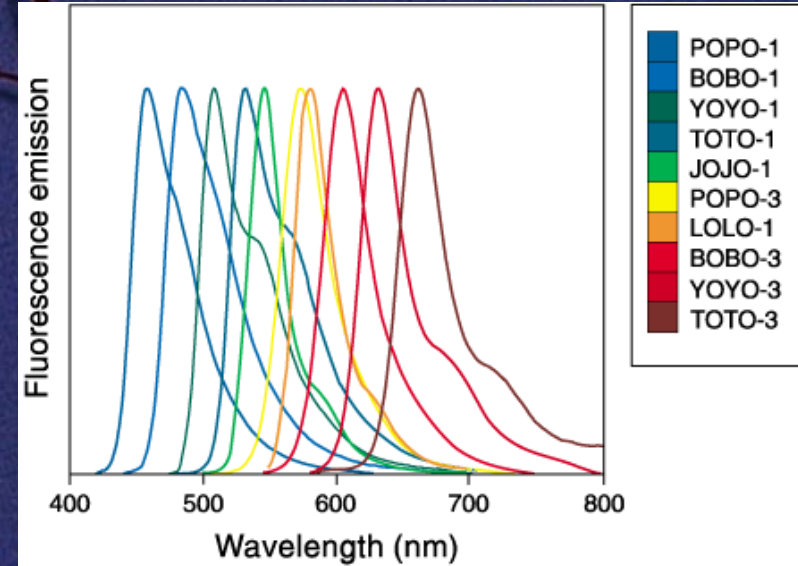
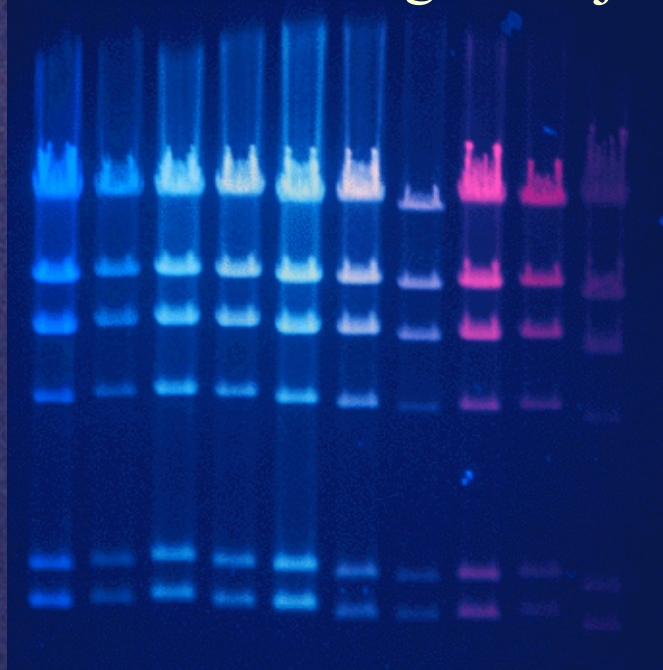
EtBr

- 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

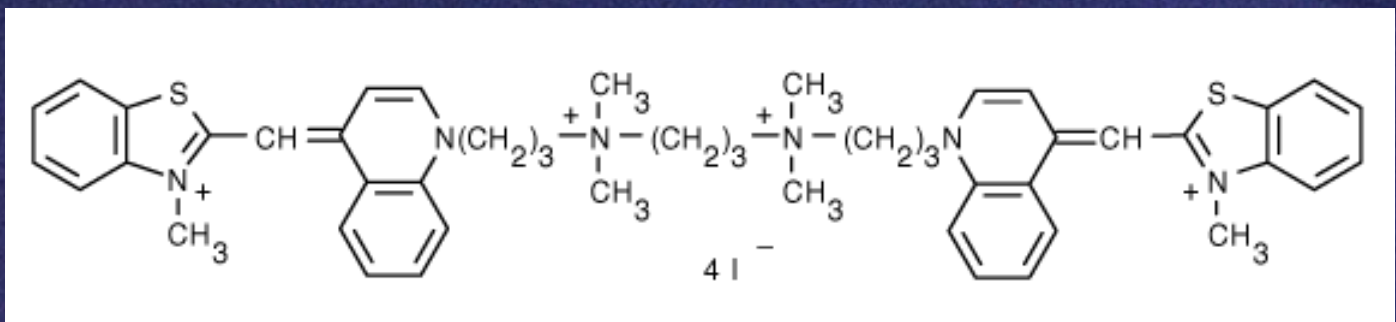
- a. POPO-1
- b. BOBO-1
- c. YOYO-1
- d. TOTO-1
- e. JOJO-1
- f. POPO-3
- g. LOLO-1
- h. BOBO-3
- i. YOYO-3
- j. TOTO-3



Citlivost 15 – 50 pg dsDNA (300 nm)

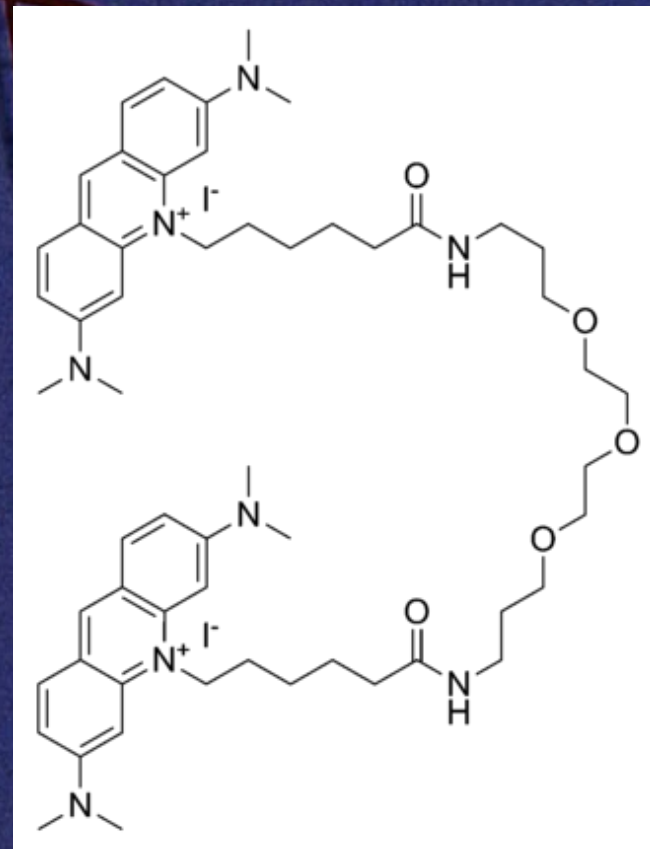
TOTO-1

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



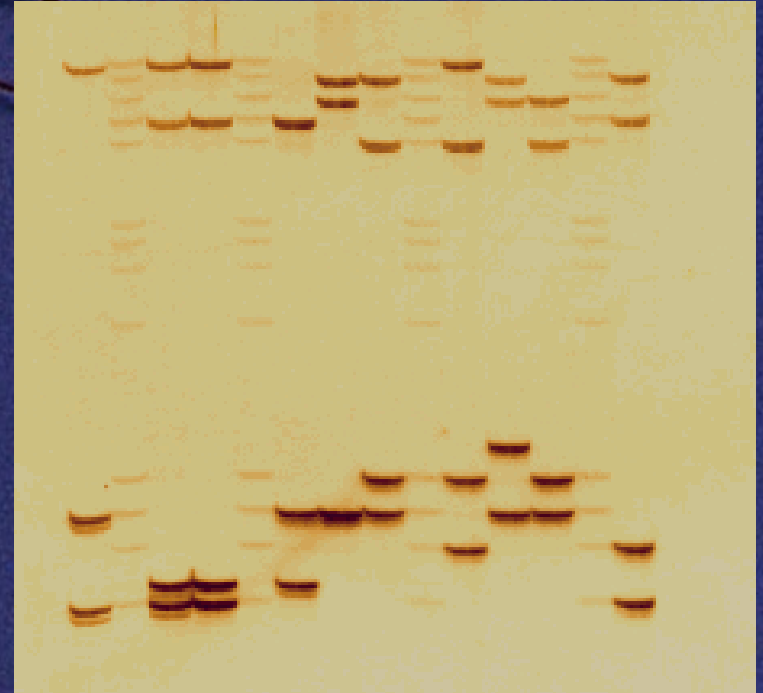
GelGreen

- GelGreen je interkalační barvivo pro nukleové kyseliny pro elektroforézu v agarózovém gelu
- Skládá ze dvou podjednotek **akridinové oranže**
- Při vystavení ultrafialovému světlu fluoreskuje nazelenalou barvou, která po navázání na DNA zesílí



Barvení stříbrem

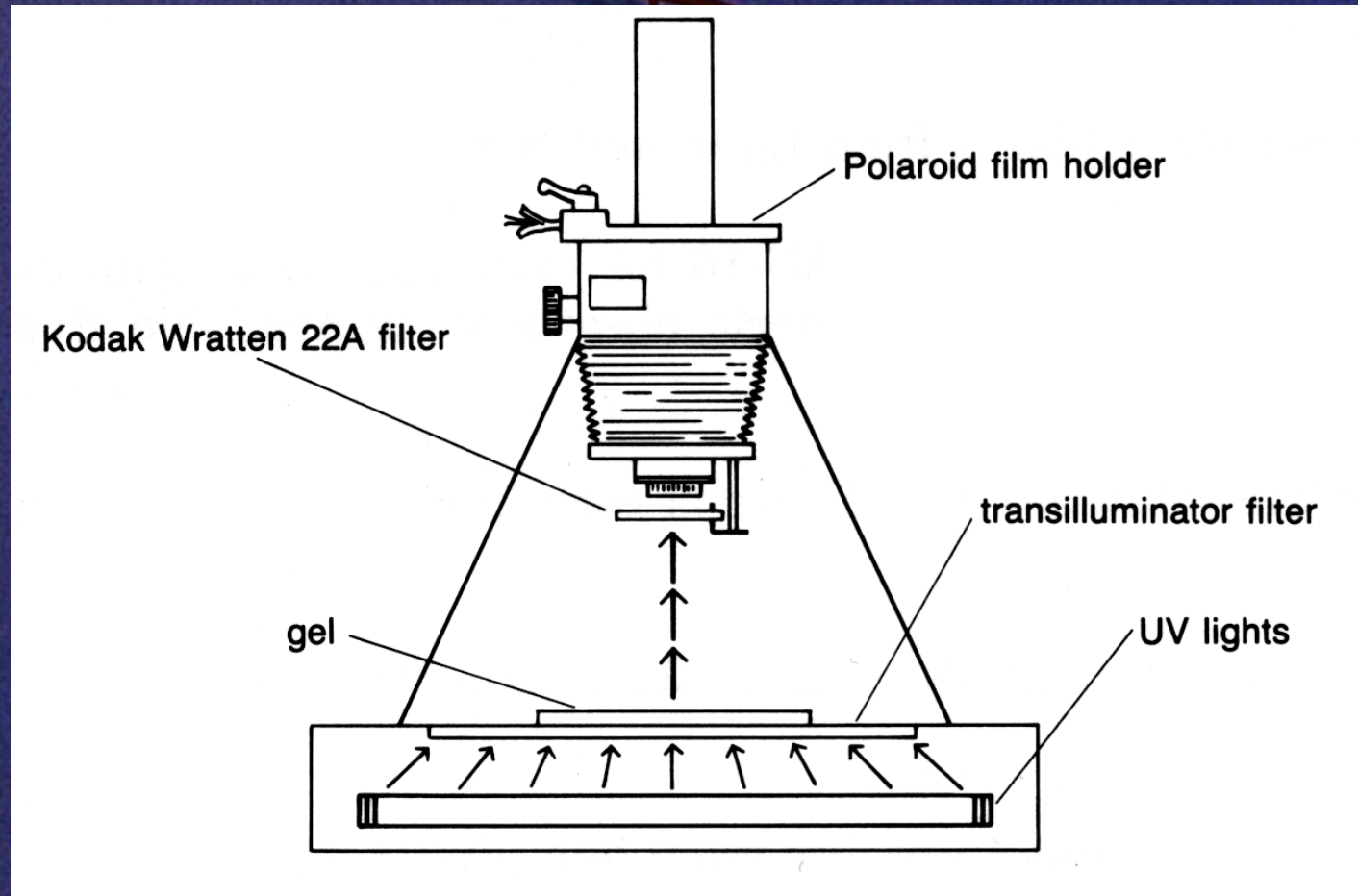
- Barvení NA stříbrem má mírně vyšší citlivost než barvením EtBr
- Citlivost 100 pg DNA v PA
- dsDNA, ssDNA i RNA
- Lepší citlivost vykazuje u polyakrylamidových gelů než u agarózových
- Barvení zahrnuje 3 kroky:
 - Fixace (metanol, ledová kyselina octová a glycerol)
 - Barvení (uhličitan sodný, dusičnan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



Dokumentace



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



Metody izolace DNA z gelu



- Elektroeluční
- Vymražování
- Zachycení na membránu
- Agaráza – enzym degradující agarózu
- Fenolová extrakce po roztavení v LMT agaróze
- Pasážování přes DEAE-Sephacel
- Komerční kity s purifikací na kolonkách

Pulzní gelová elektroforéza

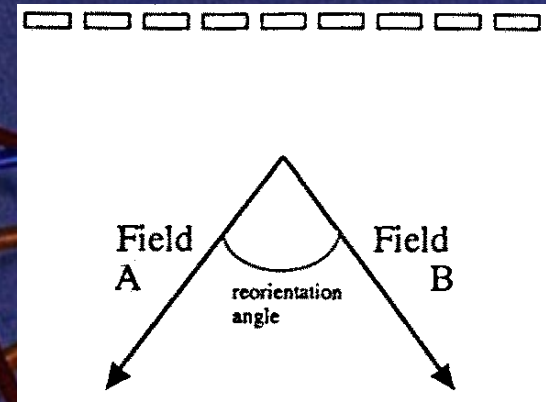


- Při konvenční gelové elektroforéze se molekuly DNA pohybují od katody k anodě přímočaře a plynule a rychlost pohybu je úměrná jejich velikosti.
- Rozdělení molekul je podmíněno rychlejším průchodem menších molekul pórovitou strukturou gelové matrice.
- Tento princip separace se uplatňuje u molekul 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 ($90-180^\circ$) 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

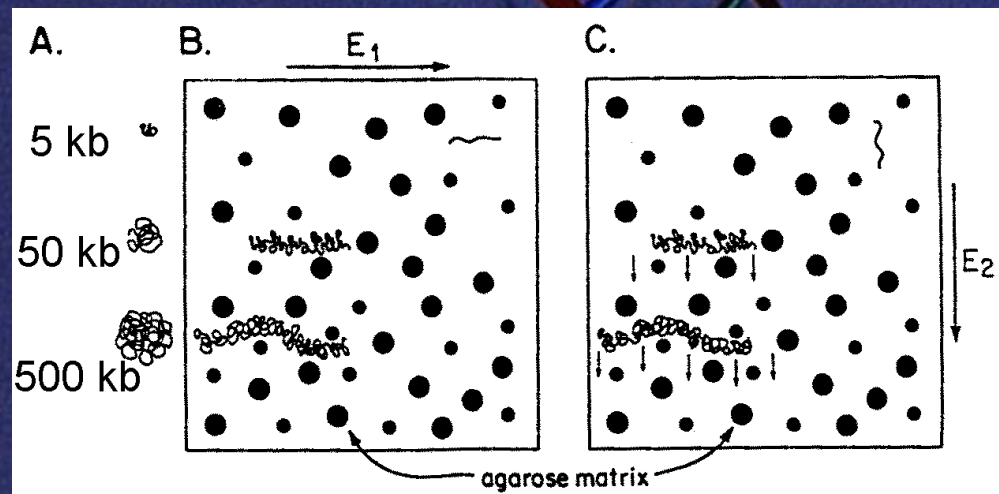


- **Pulzní pole** (pulsed field). Elektroforetický proces, který používá více než jedno elektrické pole, a ve kterém se elektrická pole střídavě aktivují.
- **Pulzní interval** (switch interval, switch time, pulse time). Čas, po který je každé ze střídajících se elektrických polí aktivováno.
- **Reorientační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

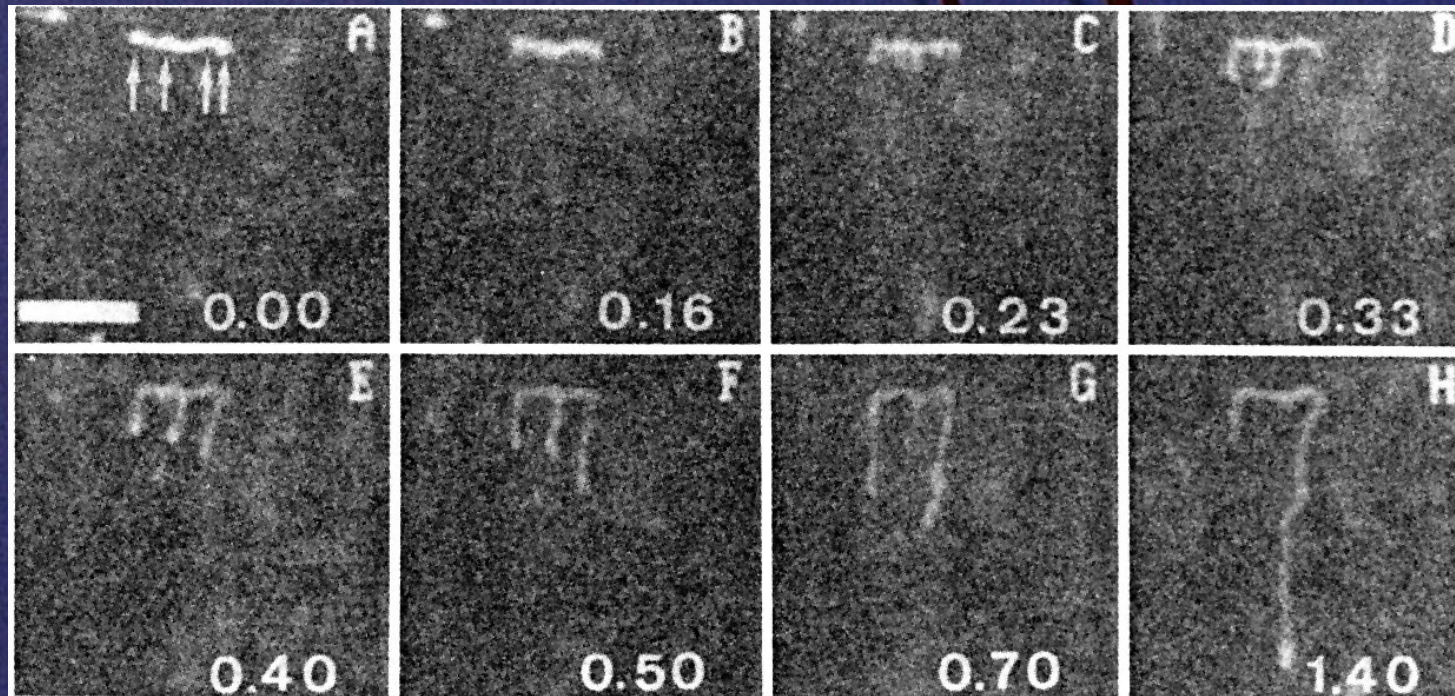


Princip separace molekul v pulzním poli

- 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.



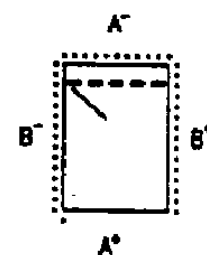
Pohyb DNA v agarózovém gelu při PFGE



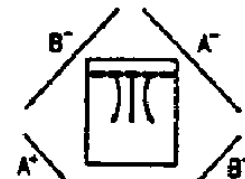
Označení systémů používaných pro pulzní elektroforézu

- **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

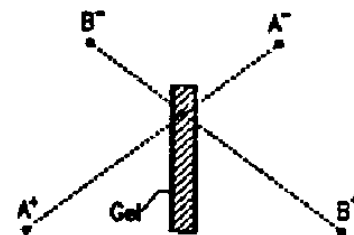
PFGE



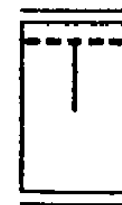
OFAGE



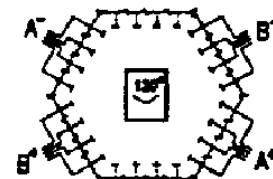
TAFE



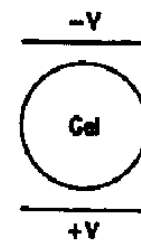
FIGE



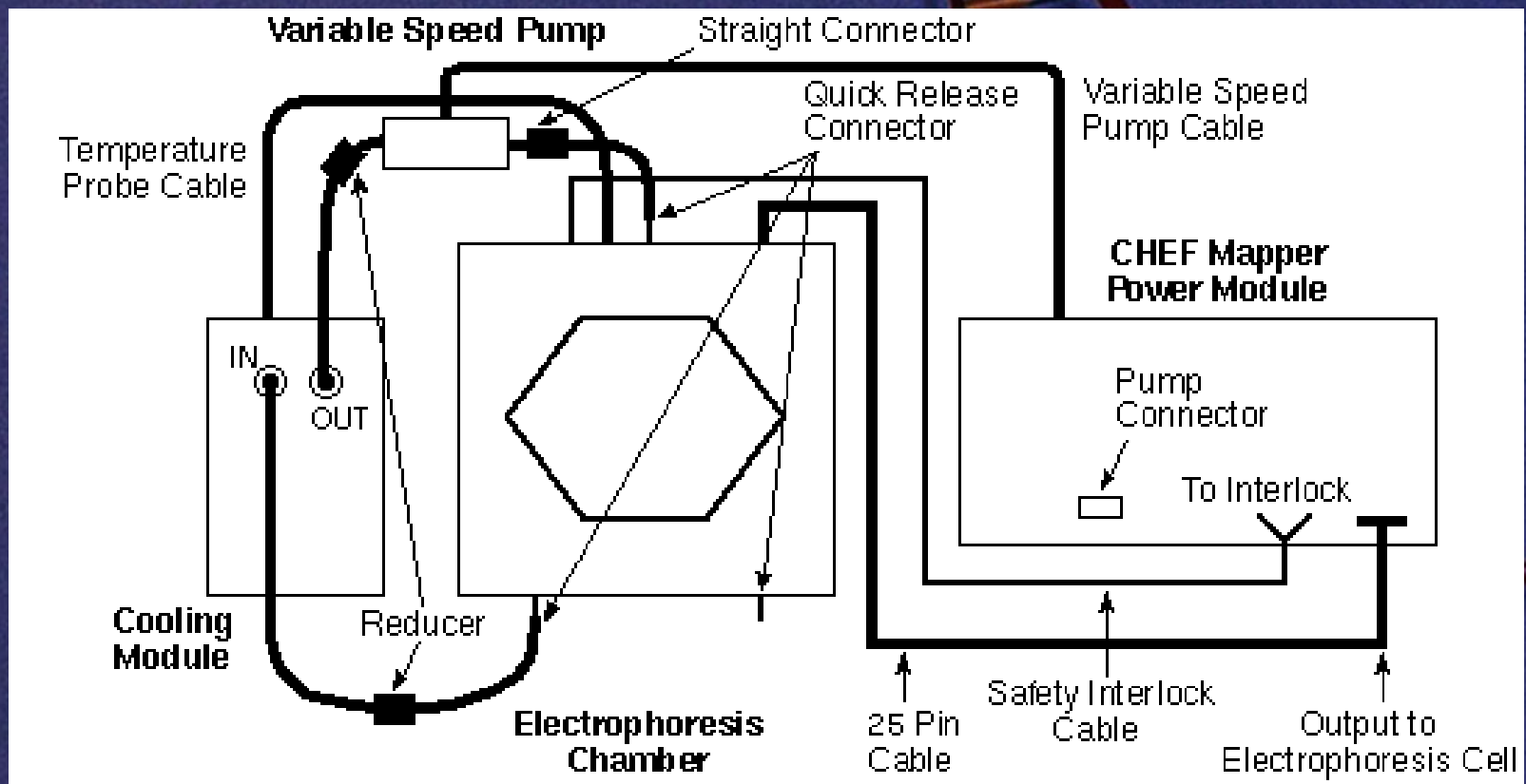
CHEF



RGE



Součásti aparatury pro PFGE



Faktory ovlivňující separaci molekul DNA při PFGE



- Napětí
- Typ agarózy
- Koncentrace agarózy
- Teplota
- Typ pufru (TAE- rychlejší migrace, TBE- pomalejší)
- Reorientační úhel
- Pulzní časy
- Zařazení sekundárních pulzních časů nebo přerušení

Vliv reorientačního úhlu

Two-state mode
30 min switch time
2 V/cm (67 V), 14 °C, 1x TAE
48 hour time
0.8% Chromosomal Grade
Agarose

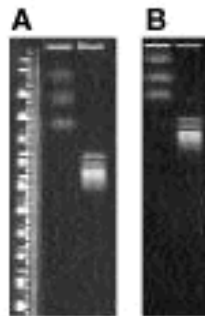


Fig. 1 Increased mobility of *S. pombe* chromosomes. A. 106° angle. B. 120° angle.

FIGE mode
180° angle
1x TAE, 14 °C
9 V/cm forward
6 V/cm reverse
Switch time 200–800 msec ramp
Forward switch time = reverse time
Run time = 18 hr
Lane 1: Bio-Rad's λ -Hind III standard
(6.6, 9.4, 23.1 kb)
Lane 2: Bio-Rad's 8–48 kb size standard
(8.3, 8.6, 10.0, 12.2, 15.0,
17.1, 19.4, 22.6, 24.8, 29.9,
33.5, 38.4, 48.5 kb)

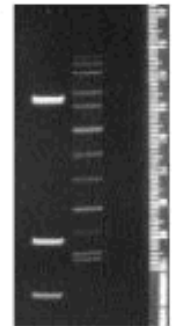
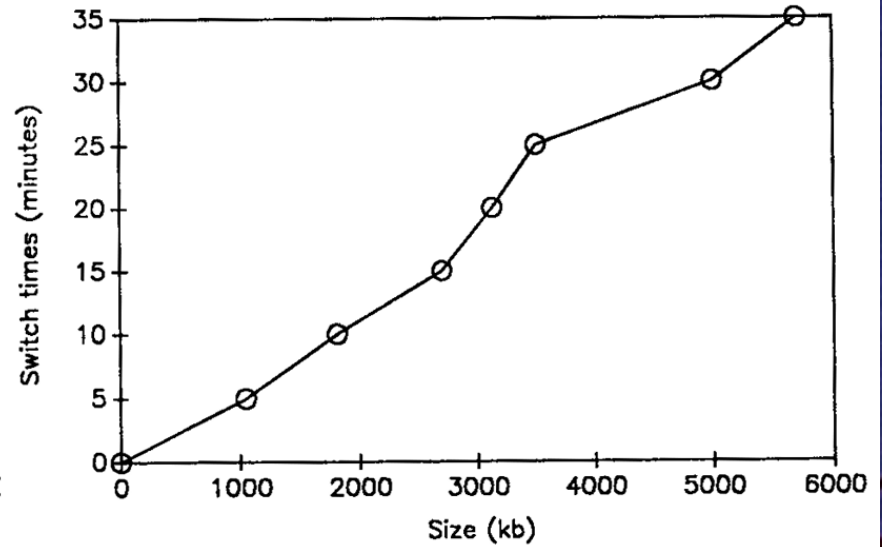
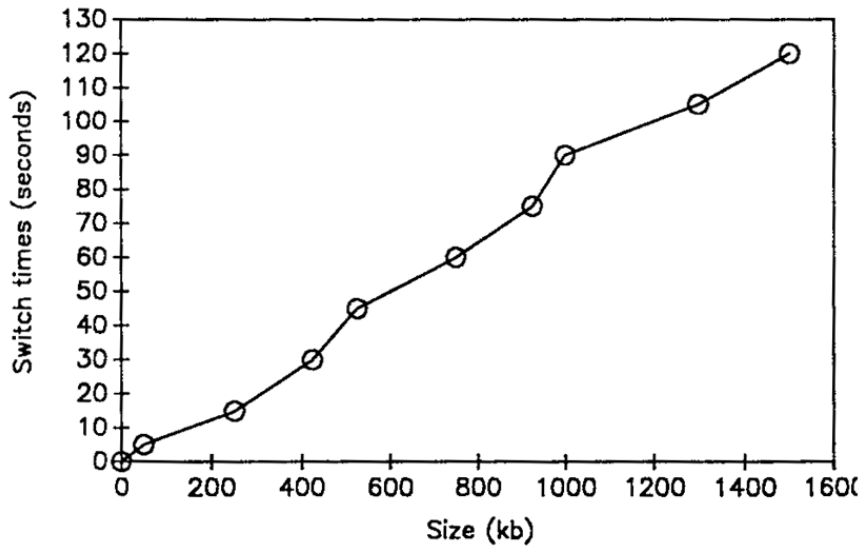
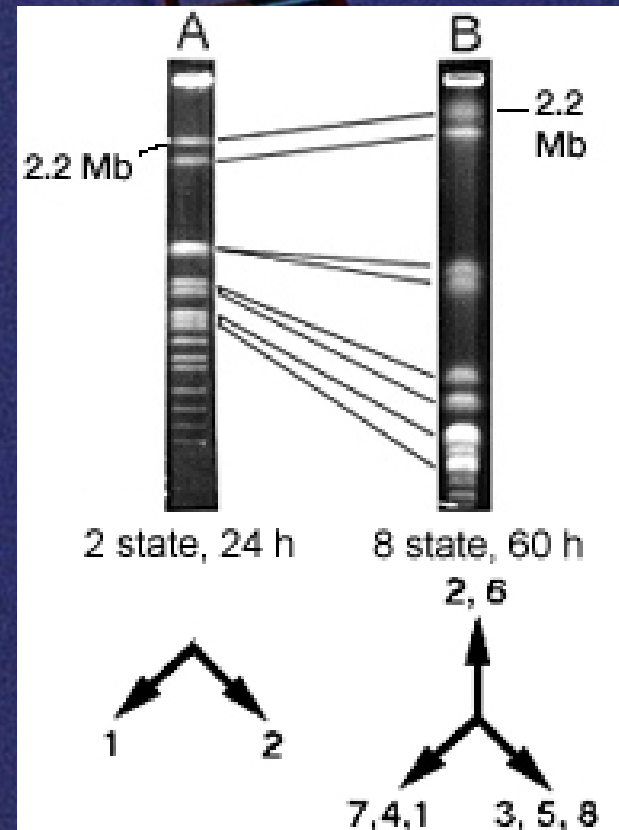
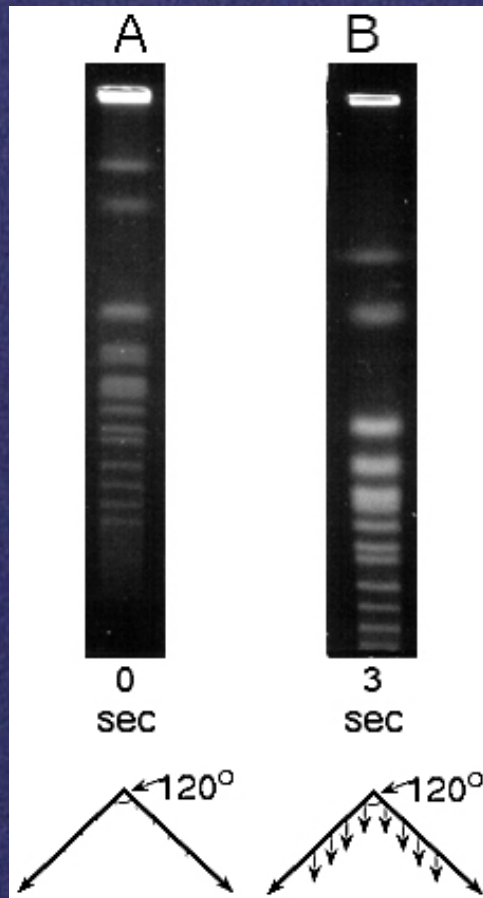


Fig. 2 High resolution of 8–48 kb size standard on the CHEF Mapper System with asymmetric voltage FIGE.

Volba pulzních intervalů v závislosti na velikosti separovaných molekul



Sekundární pulzní pole



Používané standardy velikostí pro PFGE

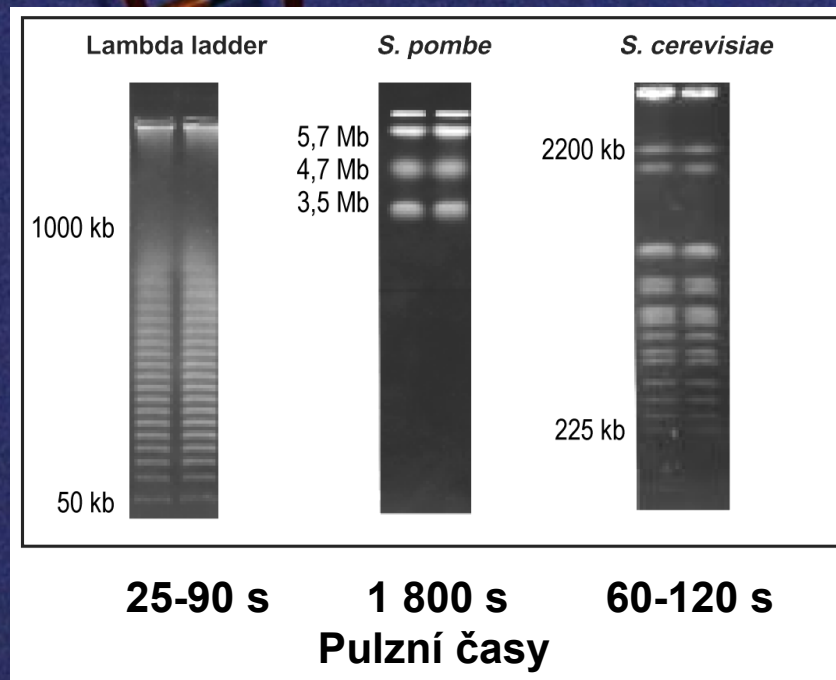
- Konkatemery plazmidů
- Konkatemery DNA fága lambda
 - Velikost monomeru 48,5 kb
- Makrorestrikční fragmenty bakteriálních genomů

- *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

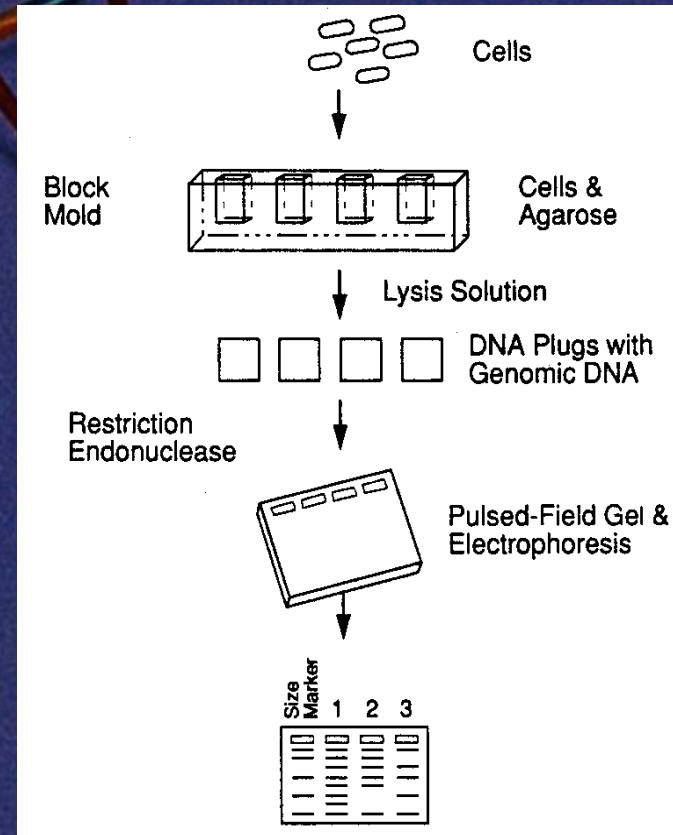
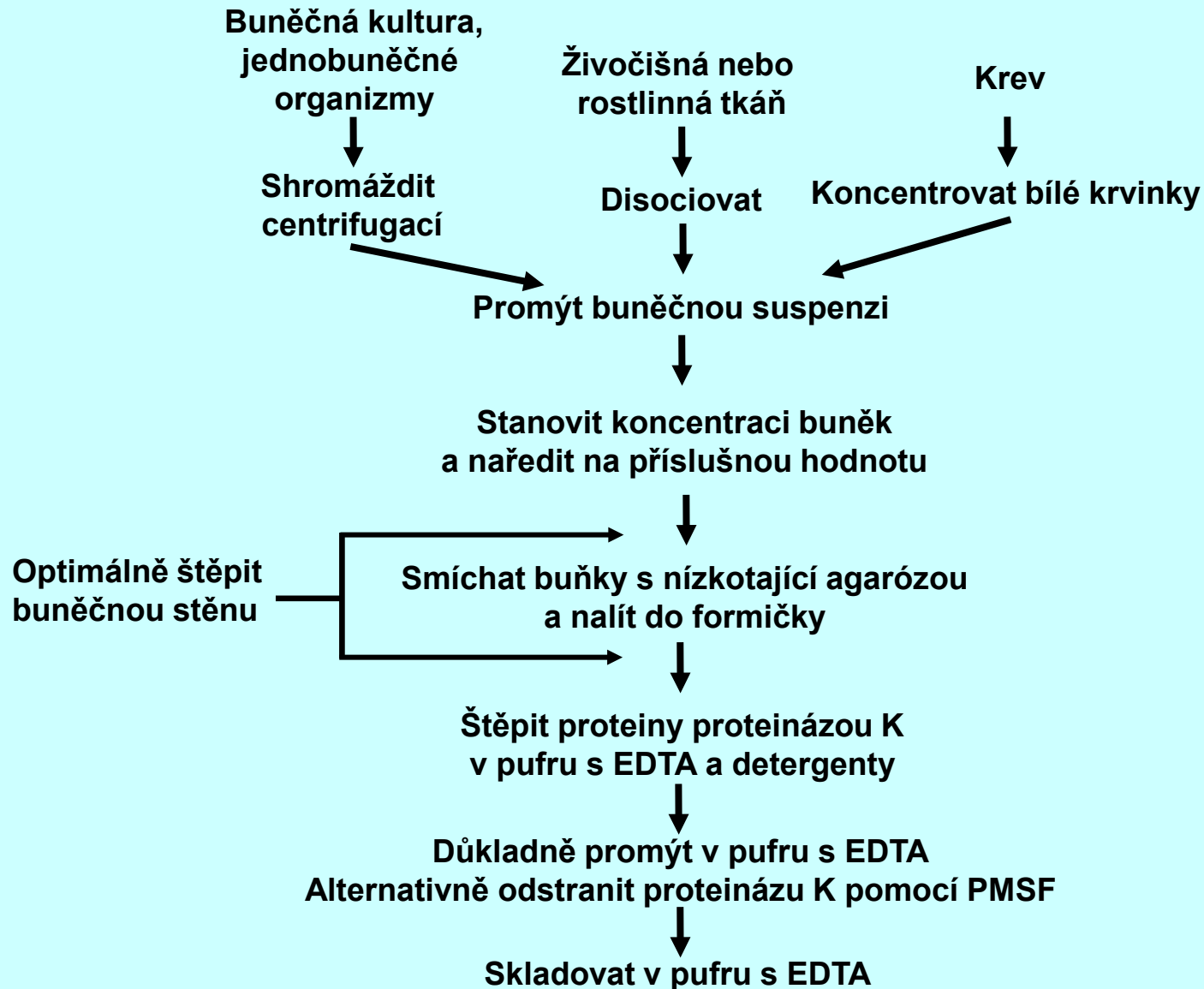
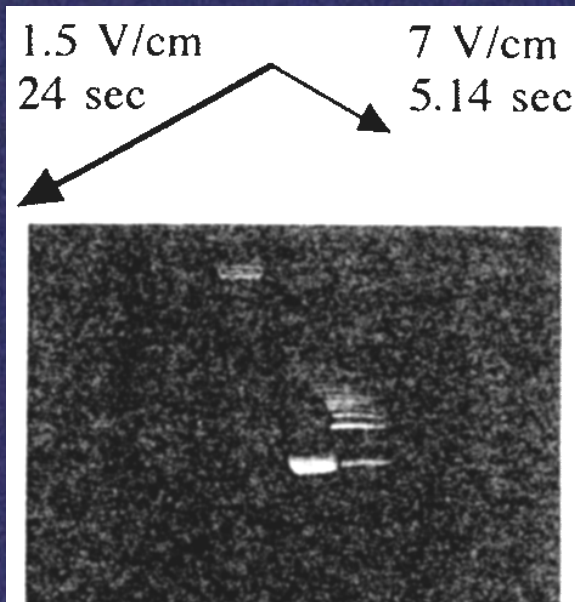


Schéma přípravy vzorků pro PFGE



Separace kružnicových molekul DNA pomocí PFGE

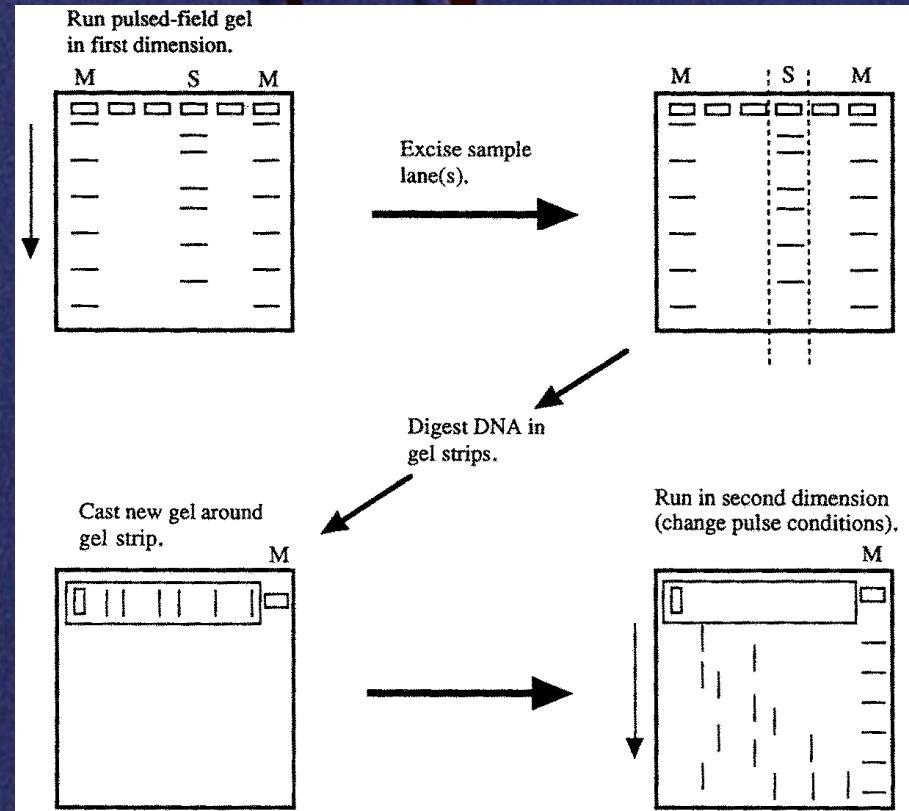
- Kružnicová DNA se pohybuje v agarózových gelech velice odlišně v porovnání s lineární DNA. Také na změny parametrů pulzní elektroforézy reaguje kružnicová DNA odlišně



Příklad separace směsi konkatemerů lineární DNA a monomeru kružnicové DNA v superhelikálním stavu. Při použití dvou různě silných polí putují lineární molekuly v jedné dráze, kdežto kružnicové z této dráhy vybočí.

Dvourozměrná gelová elektroforéza

- Pro preparativní účely
- Má využití zejména při konstrukci restričních map malých replikonů a při klonování



Interpretace elektroforetických vzorů proužků a konstrukce dendrogramů

- Otisk DNA je výsledkem většiny molekulárních metod.
- Získaný vzor, který je viditelný na obarvených elektroforetických gelech nebo vyvolaných hybridizačních membránách
 - Je specifický pro izoláty určitého klonálního původu
 - Vzorem se rozumí skladba určitých znaků (kvantitativně vyjádřených) jimiž se vyznačuje daný objekt.
 - Znakem je fragment DNA určité velikosti, u kterého se hodnotí přítomnost nebo nepřítomnost nebo jeho plocha.
- Při DNA-typizaci jedinců získáme velkou množinu dat, kterou je třeba převést do prezentovatelné formy určením tříd nebo skupin.
- K tomuto účelu se využívá **shluková analýza**
 - využívá se k nalezení hierarchického seskupování množin dat s mnoha proměnnými
 - redukuje počet objektů jejich umístěním do skupin

Měření podobnosti.



- Při určování podobnosti elektroforetického vzoru (dvou drah proužků) a tím i podobnosti mezi dvěma izoláty se využívají koeficienty podobnosti založené na
 - Přítomnosti nebo absenci proužků
 - denzitometrických hodnotách.
- Koeficienty založené na prouzcích

– *Jaccardův koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{n_{i,j}}{n_i + n_j - n_{i,j}}$$

– *Diceho koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{2n_{i,j}}{n_i + n_j}$$

– *Plošně citlivý koeficient:*

$$S_{i,j} = \frac{A_{i,j}}{n_i + n_j + n_{i,j}}$$

$$A_{i,j} = \sum_{k=1}^{n_{i,j}} \frac{\alpha}{\alpha + |B_{i,k} - B_{j,k}|}$$

$S_{i,j}$ = podobnost mezi i -tou a j -tou řadou proužků

n_i = počet proužků v i -té dráze

n_j = počet proužků v j -té dráze

$n_{i,j}$ = počet odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze

$A_{i,j}$ = hodnota vycházející z počtu odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze, zohledňující rozdíly v plochách odpovídajících si proužků

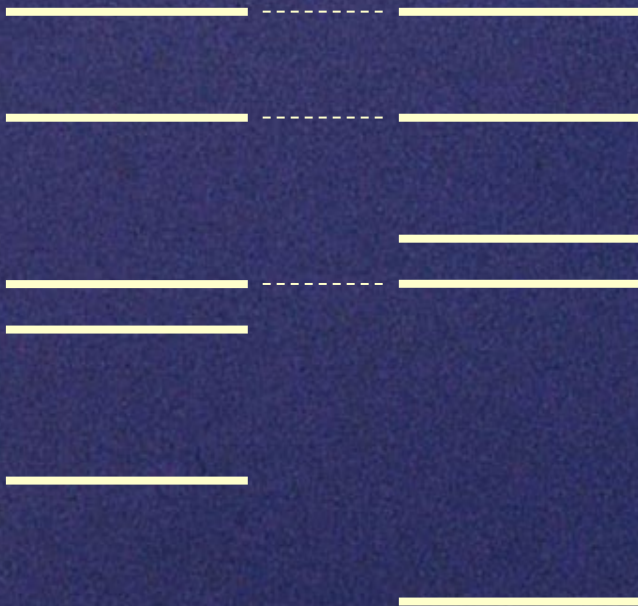
α = konstanta

$|B_{i,k} - B_{j,k}|$ = absolutní hodnota rozdílu ploch k -tých odpovídajících si proužků v i -té a j -té dráze

Výpočet koeficientu podobnosti

A

B



$$S_{i,j} = \frac{2n_{i,j}}{n_i + n_j}$$

$$S_D = 2 \times 3 / (5 + 5)$$

$$S_{i,j} = \frac{n_{i,j}}{n_i + n_j - n_{i,j}}$$

$$S_J = 3 / (5 + 5 - 3)$$

Shluková analýza

1. Metody nehierarchické
 - dávají jednoduché rozdělení, které optimalizuje homogenitu uvnitř skupiny
2. Metody hierarchické
 - členové níže zařazených shluků se stávají členy větších výše zařazených shluků, výsledkem je zobrazení souhrnu jejich hierarchie
 - A. Dělicí
 - Začínají s předpokladem, že všechny objekty jsou částí jednoho shluku
 - Algoritmus štěpí tento velký shluk krok za krokem dokud každý objekt netvoří samostatný shluk
 - B. Aglomerační
 - Na začátku každý shluk obsahuje jeden objekt
 - Shluky jsou postupně spojovány
 - cílem obdržet přímé znázornění příbuznosti mezi objekty
- Výsledek hierarchického shlukování je obvykle zobrazen jako dendrogram, ve kterém jsou zobrazeny následné jednotky shluků společně s hodnotami podobnosti vedoucím k těmto jednotkám

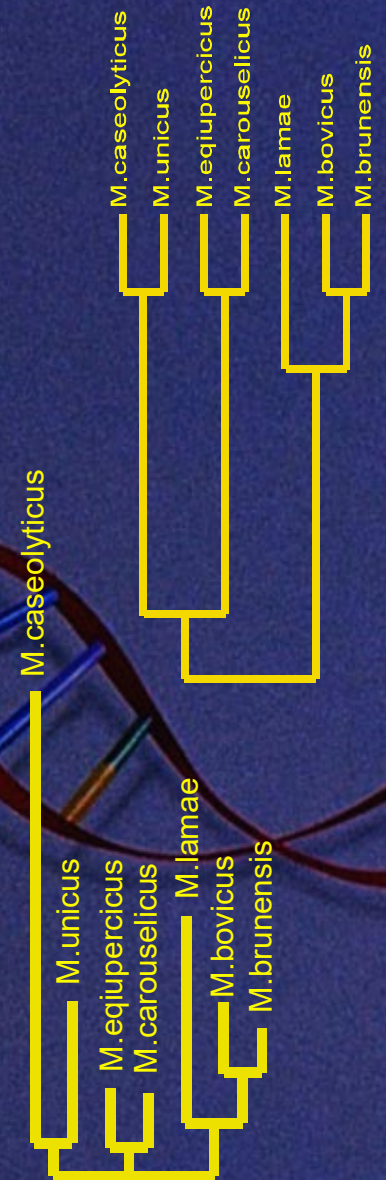


Algoritmus hierarchických aglomeračních metod shlukování

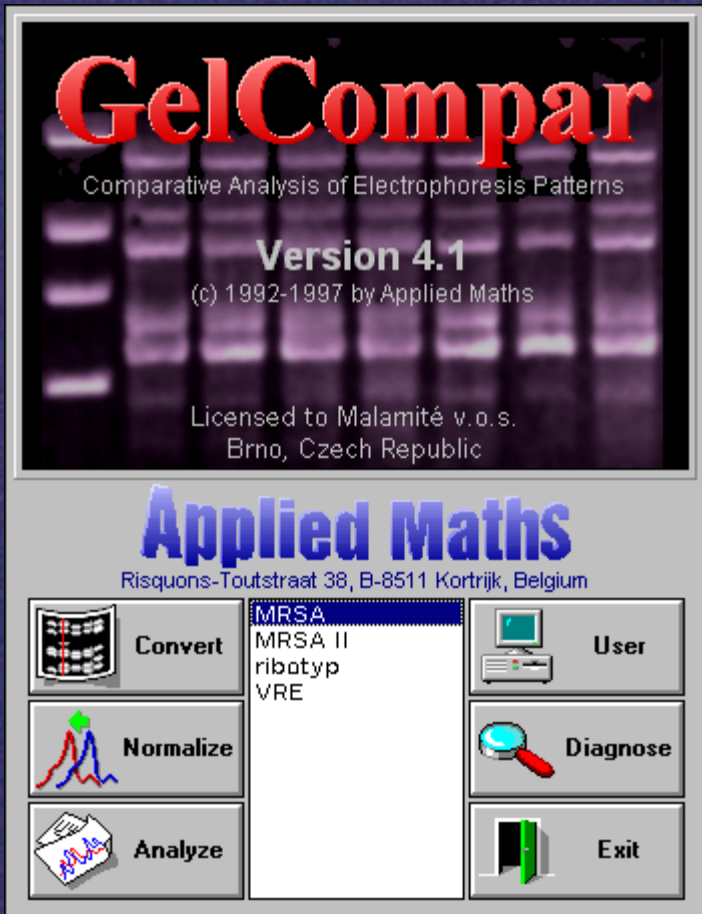
1. Vytvoření množiny dat.
 - Soubor hodnot, které nabývají objekty na základě množství znaků.
2. Transformace dat.
 - Sjednocení jednotek, vyřazení kvalitativně rozdílných znaků.
3. Sestavení matice podobnosti nebo rozdílnosti.
 - Na základě měření podobnosti nebo rozdílnosti každého páru objektů.
4. Shlukování.
 - Výběr vhodného algoritmu, což je v podstatě vztah pro opakovaný výpočet rozdílnosti nebo podobnosti nového shluku s ostatními shluky.
5. Dendrogram.
 - Znázornění postupného shlukování jednotlivých objektů grafickou formou.

Nejčastěji používané metody pro shlukování

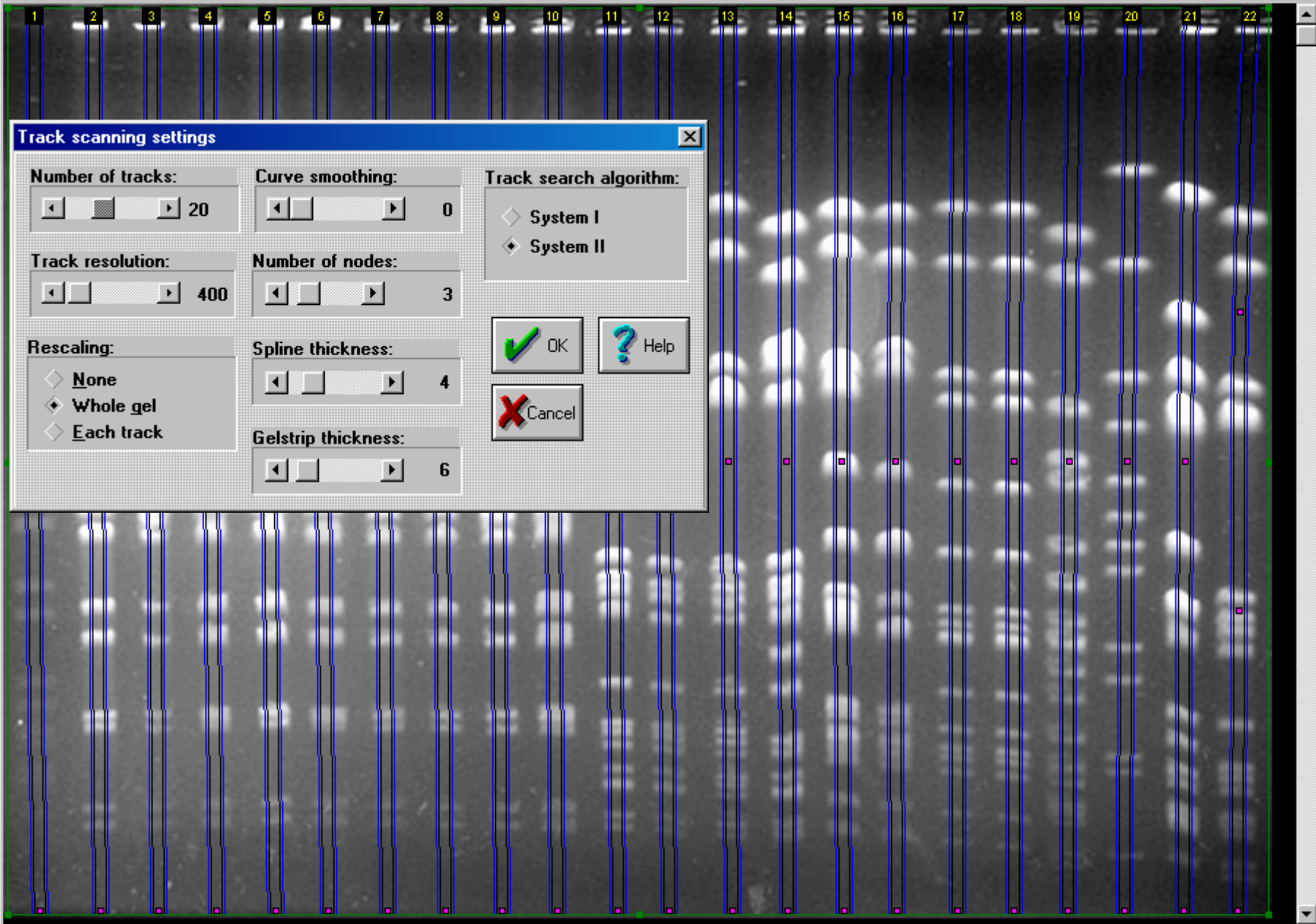
- Metoda nevážených průměrů párových skupin (unweighted pair group average method, UPGMA).
 - Shluky jsou spojovány na základě průměrné vzdálenosti mezi všemi členy ve dvou skupinách.
 - Tato metoda se využívá při vyhodnocování otisků DNA (elektroforetických vzorů)
- Jednoduché spojování (neighbour joining, metoda nejbližšího souseda).
 - Shluky jsou spojovány na základě nejmenší vzdálenosti (největší podobnosti) mezi dvěma skupinami.
 - Metoda má použití při sestavování fylogenetických stromů odvozených z porovnávání částečných sekvencí konzervovaných genů, např. 16S a 23S rRNA.



Software pro 1D gely



- Applied Maths: GelCompar
- BIO-RAD: Quantity One
- KODAK: Molecular Imaging Software
- Scanalytics: GELLAB
- Biocompare: Gel Doc
- Fotodyne: Phoretix
- Jenson: UVIsoft Gel Analysis



Track scanning settings

Number of tracks:

Curve smoothing:

Track search algorithm:
 System I
 System II

Track resolution:

Number of nodes:

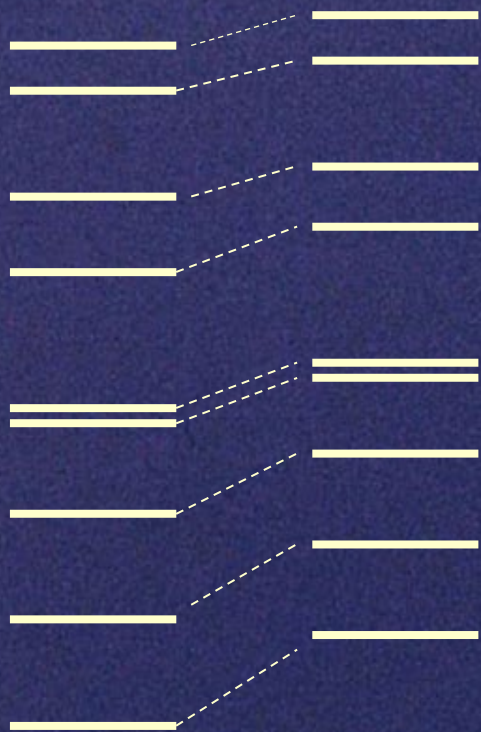
Rescaling:
 None
 Whole gel
 Each track

Spline thickness:

Gelstrip thickness:

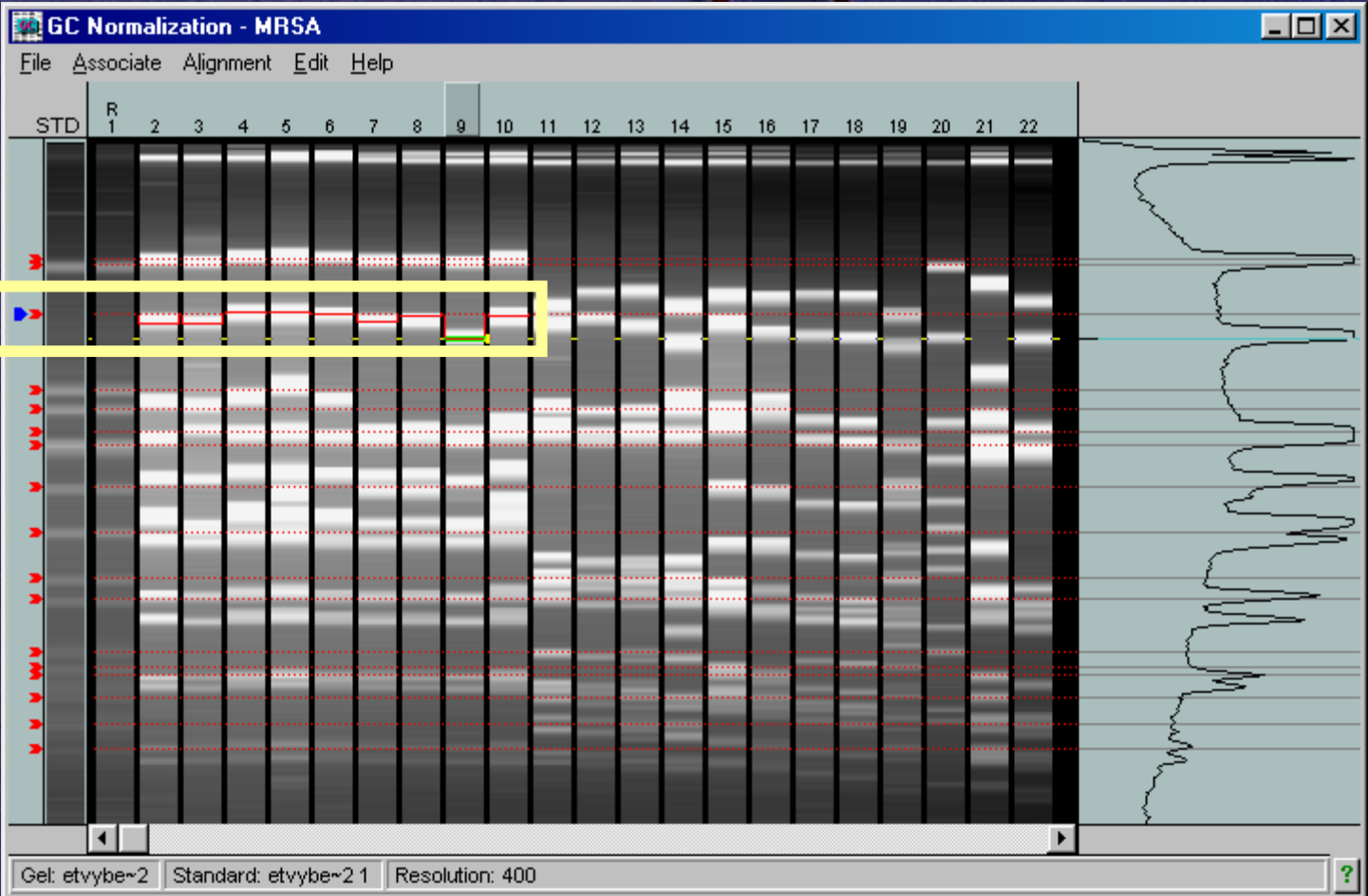
OK Help
 Cancel

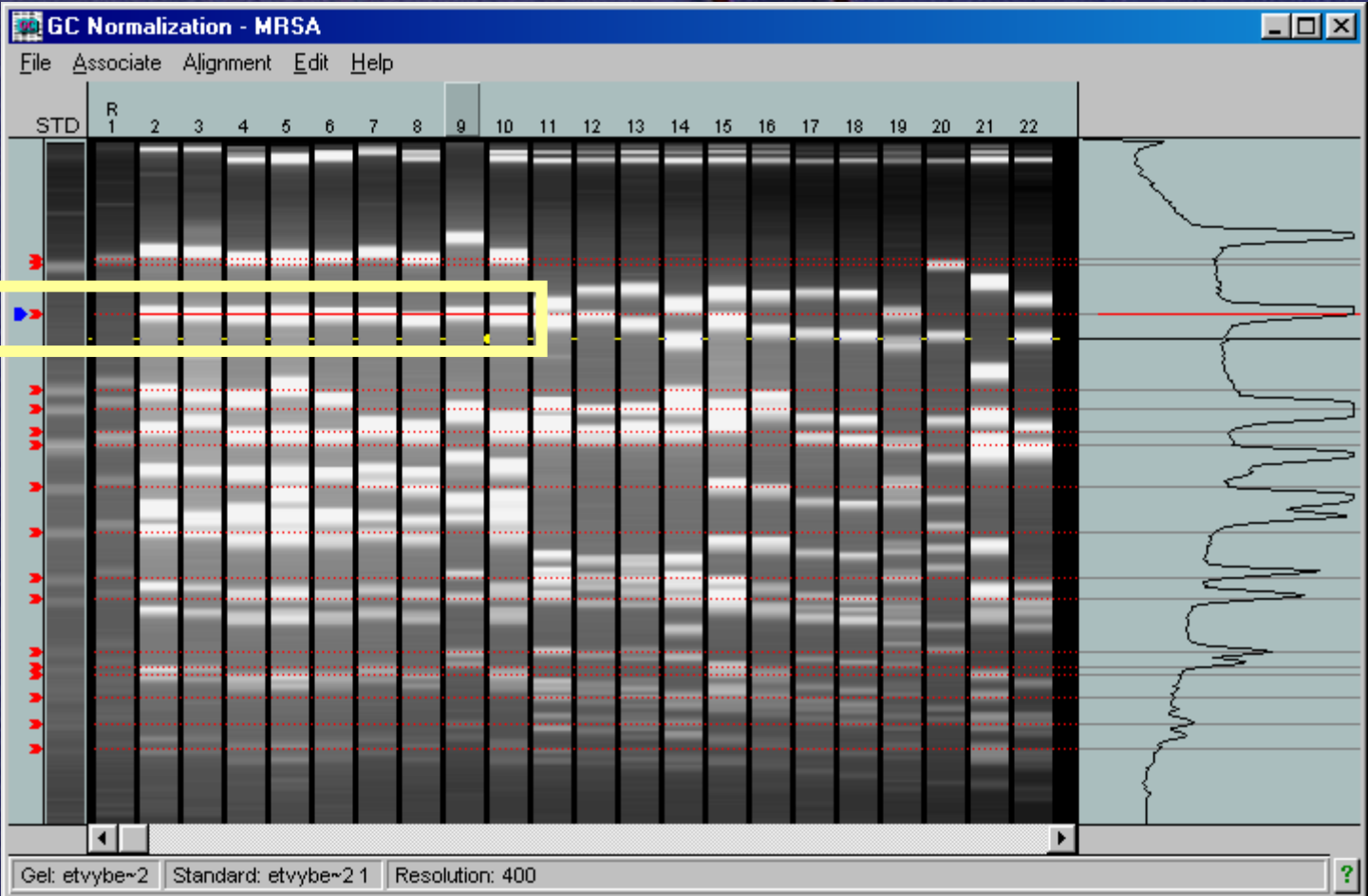
Princip normalizace vzorů



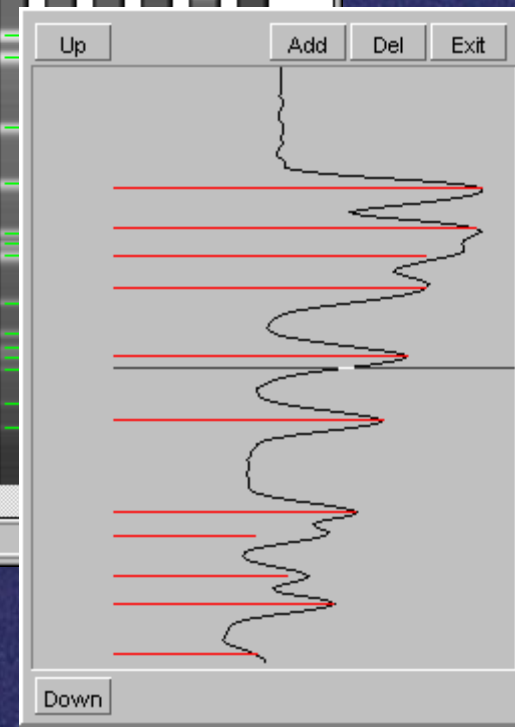
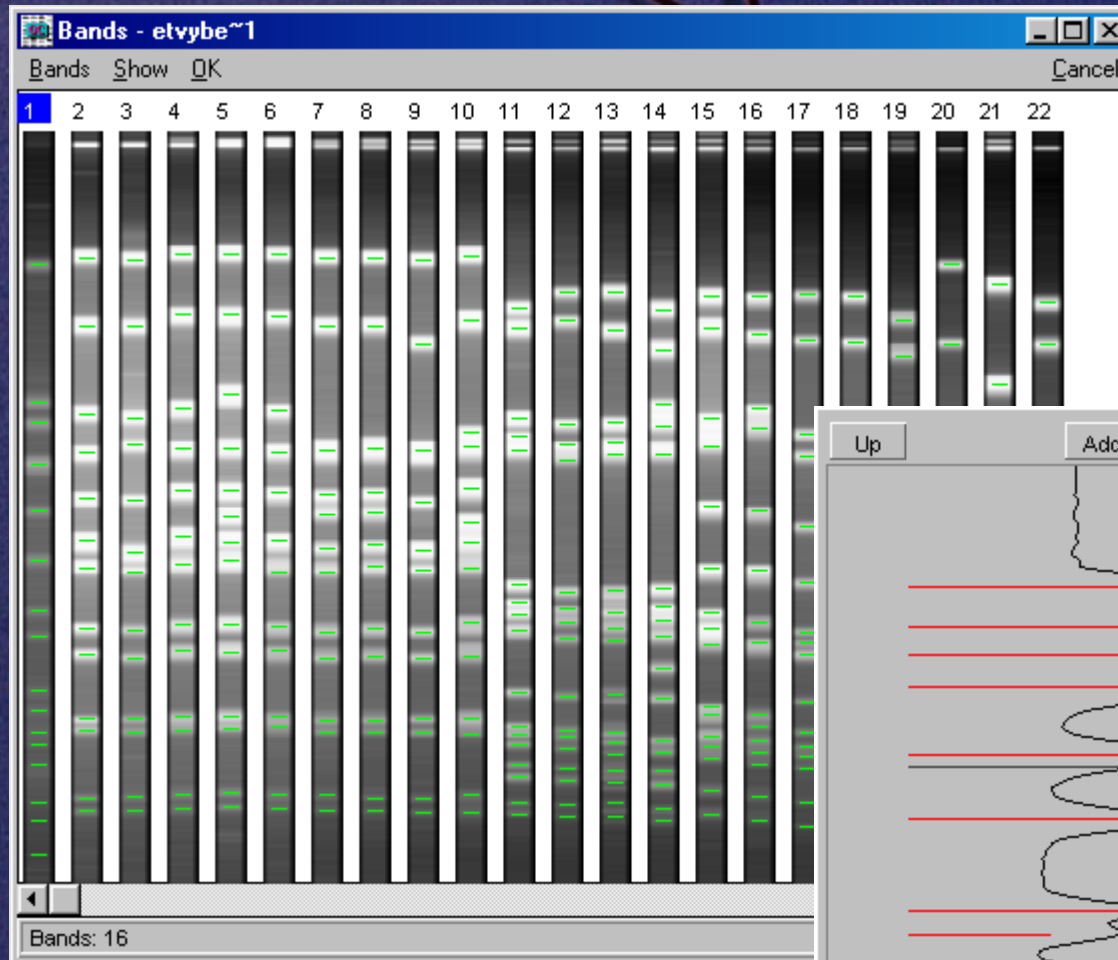
Referenční vzor – přítomný v každé 6. dráze



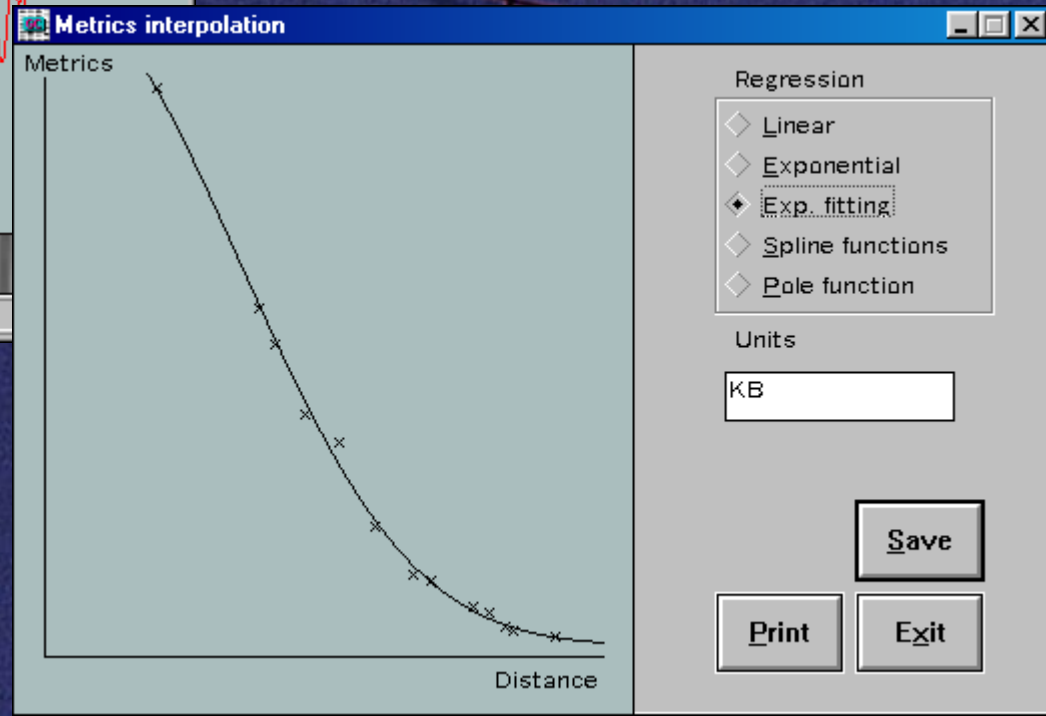
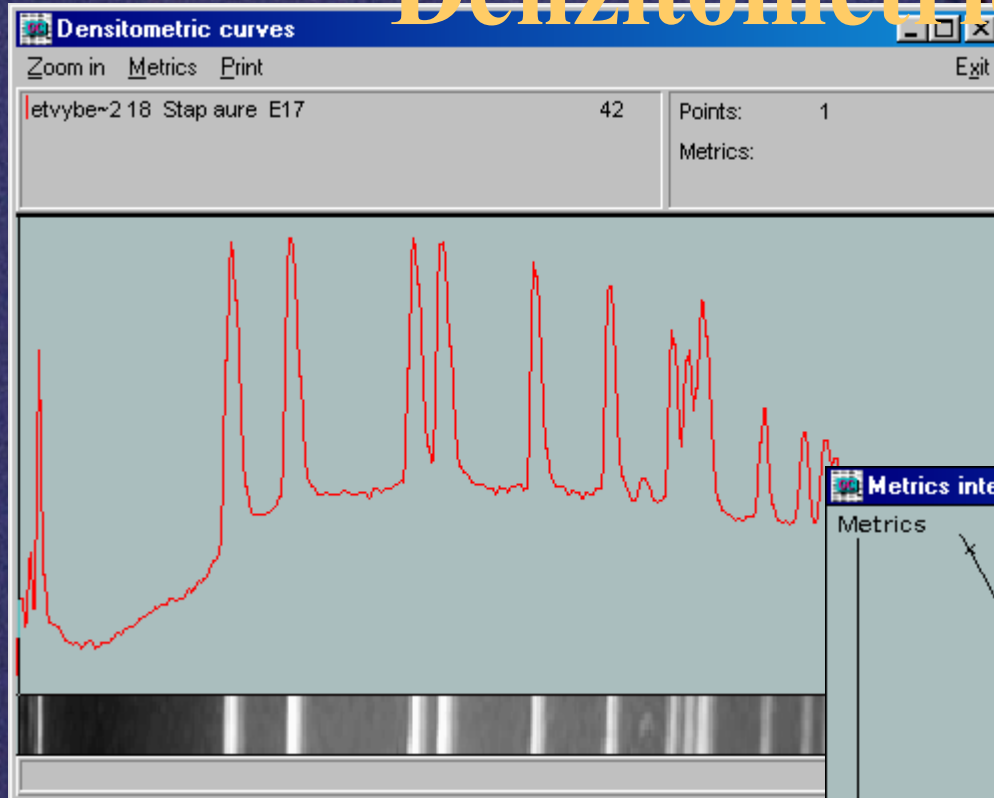




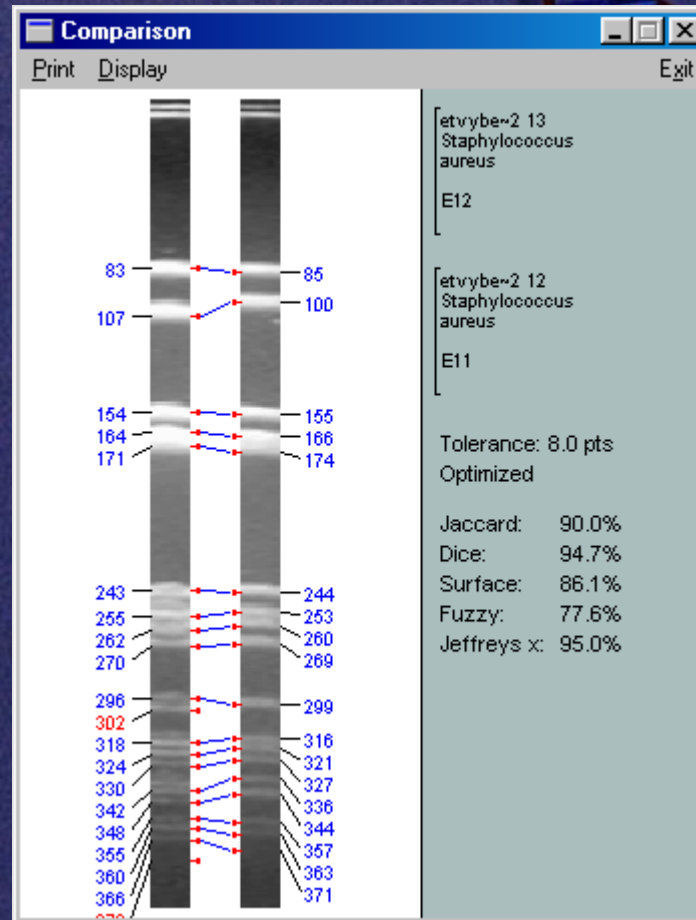
Bands – automatická identifikace pruhů na gelu



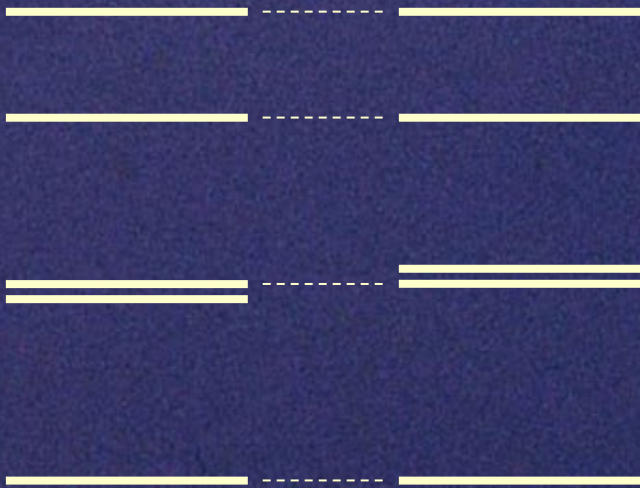
Denzitometrické křivky



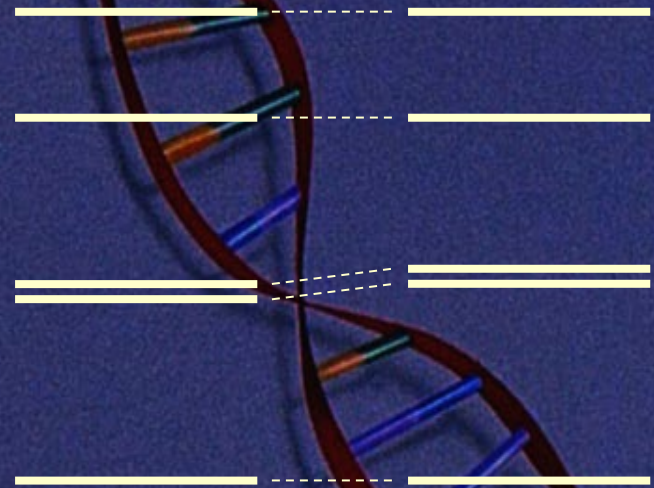
Výpočet koeficientu podobnosti



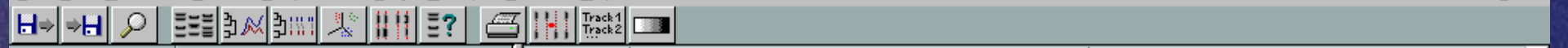
Optimalizace rozpoznávání vzoru



bez optimalizace



s optimalizací



ETV...
ETV...
MRS...
OPIC...
PFMF...
PFZM...
<==...
- [F]...
- [E]...
- [D]...
- [C]...
- [B]...
- [A]

etvybe~1 1

8325
492/98
435/98
99/49
191/01
620/01
459/03
063/04
534/98
257/01
018/02
538/98
439/98
106/02
596/03
021/04
585/03
130/04
885
237/03

etvybe~1

File	Gel	Track	Exit
→1R		8325	
→2		492/98	
3		618/01	
4		424/02	
→5		435/98	
→6		99/49	
→7		191/01	
→8		620/01	
→9		459/03	
→10		063/04	
→11		534/98	
→12		257/01	
→13		018/02	
→14		538/98	
→15		439/98	
→16		106/02	
→17		596/03	
→18		021/04	
→19		585/03	
→20		130/04	
→21R		885	
→22		237/03	

C:\GCW41\MRSA\GELS.INT\ETVYBE~1.INT Standard: mrsako~1 1 Resol.: 400 ?

Grouping Analysis

Coefficient:

- Jaccard
- Dice
- Area
- Fuzzy logic
- Jeffreys χ coefficient

Optimization

Position tolerance...

Clustering method:

- UPGMA
- Ward
- NJ

OK Cancel

Help

Band settings

Band search filters:

Minimal profiling (%)

Minimal area (%)

Shoulder sensitivity 7

Nonlinear fit

Band comparison settings

Position tolerance (%)

increase (%)

Minimal area (%)

OK Cancel Help

