



Analýza nukleových kyselin pomocí elektromigračních metod

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2012

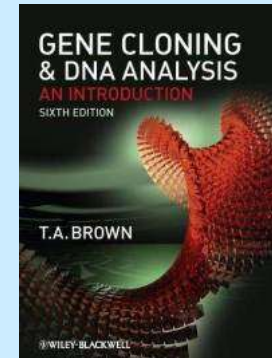
Obsah přednášky

- 1) Elektroforéza – základní informace**
- 2) Typy elektroforéz**
- 3) Stanovení velikosti fragmentů elektroforézou**
- 4) Různé typy barvení gelů**
- 5) Pulsní gelová elektroforéza**
- 6) Denaturační elektroforéza**
- 7) Kapilární elektroforéza**

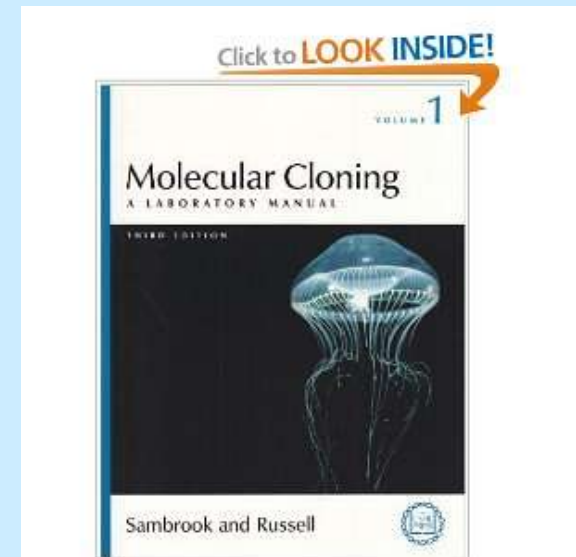


Doporučená literatura

Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition



Sambrook and Russell (2001): Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA



V červnu 2012 vyšlo 4. vydání

– autoři Green and Sambrook

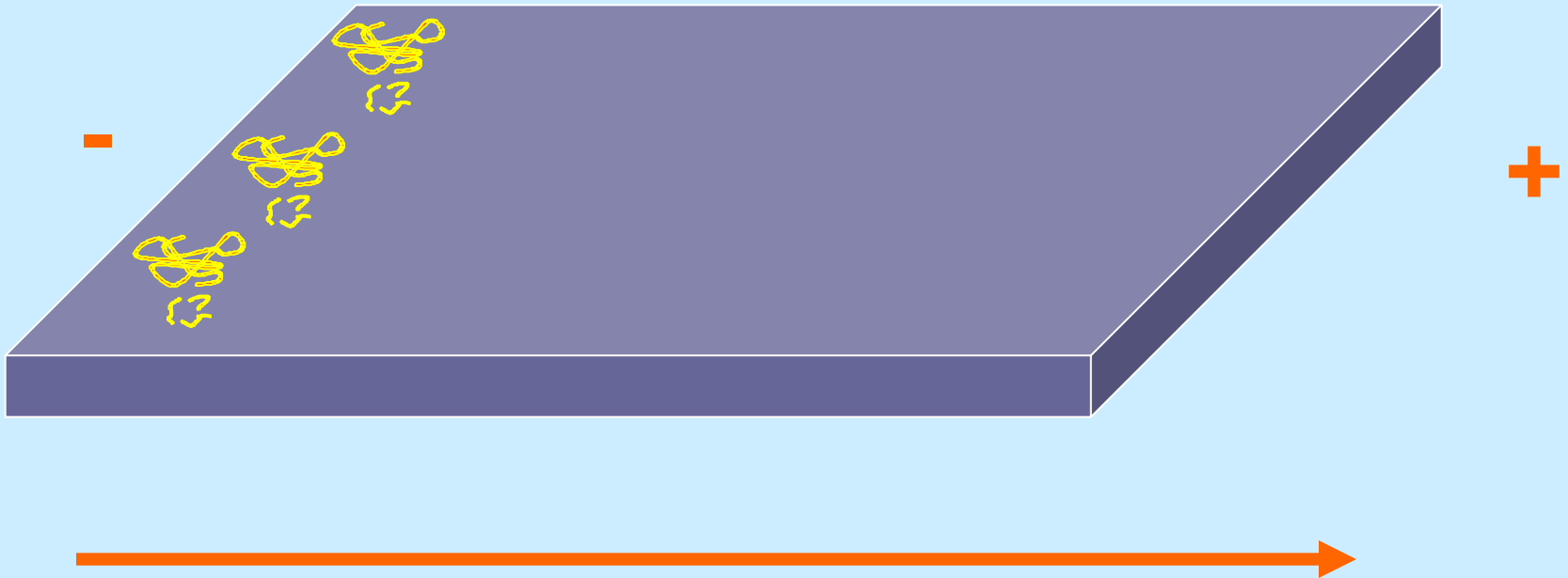
Elektroforéza nukleových kyselin



Princip elektroforézy

Pohyb nabitých molekul v elektrickém poli

Dělení molekul na základě rozdílných pohyblivostí, které závisí na: náboji, velikosti (hmotnosti) a tvaru

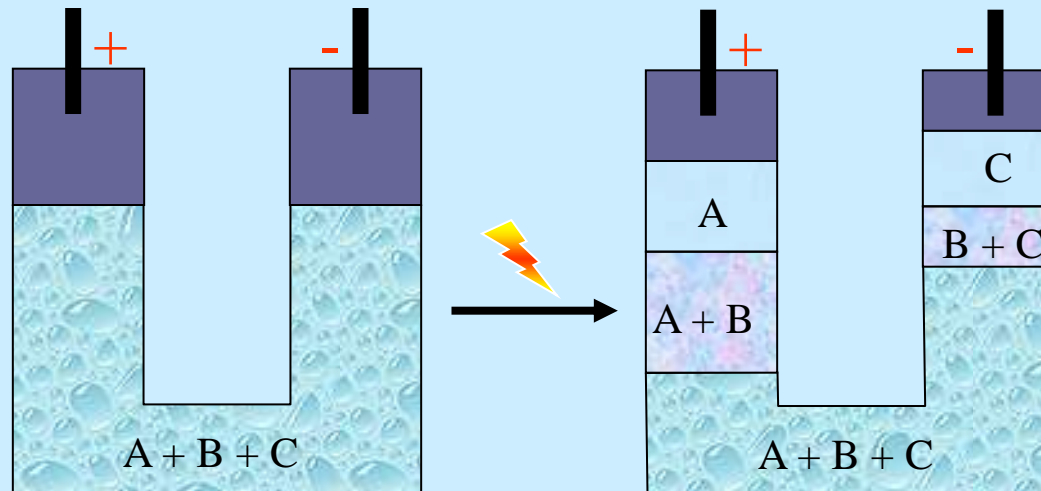


Dělení podle prostředí

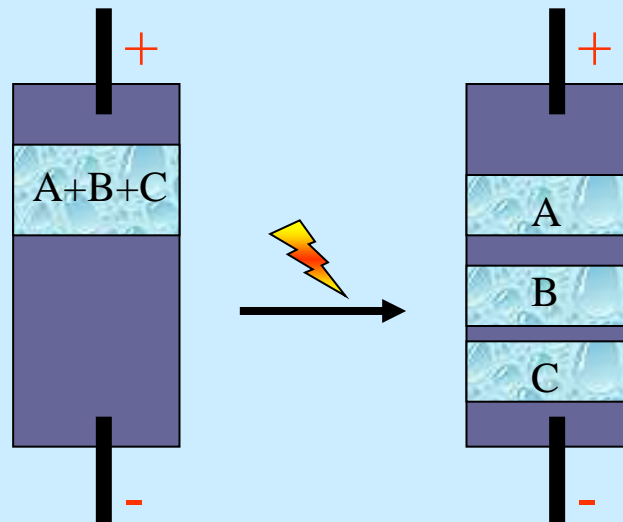
Volná elektroforéza (v roztoku)

Zónová elektroforéza (na nosiči, gelová)

Volná elektroforéza



Zónová elektroforéza

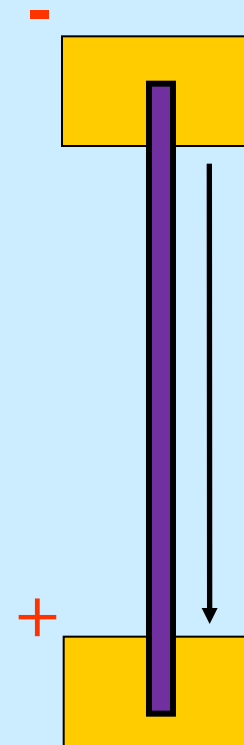


Dělení podle uspořádání

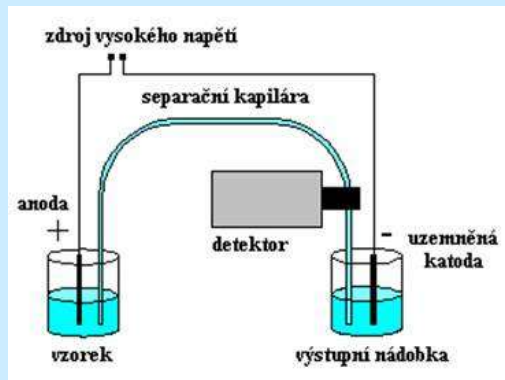
Horizontální



Vertikální



Kapilární

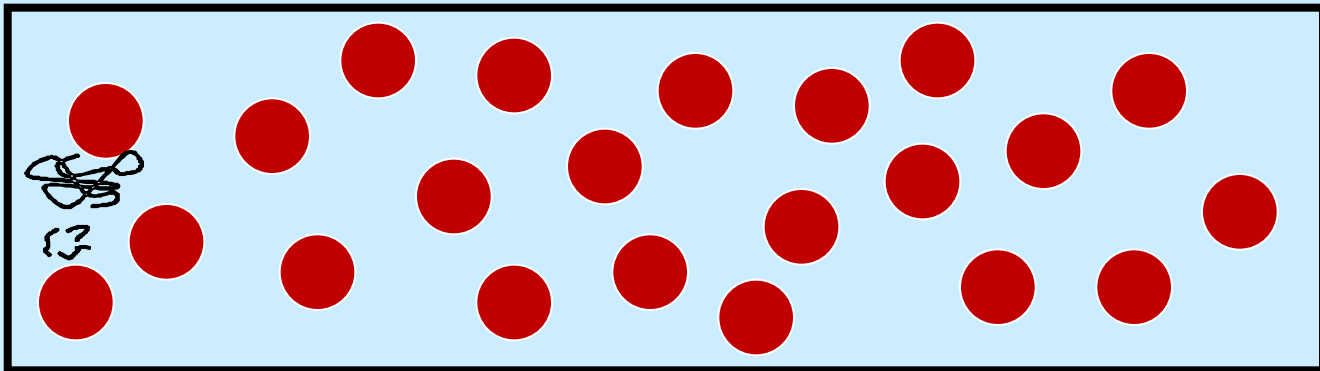


Vlastnosti elektroforézy

- **Z praktických důvodů se elektroforéza neprovádí přímo v roztoku, ale na vhodném nosiči (většinou gel)**
- **Pro přípravu gelu jsou výhodné látky, které samy gelují a mají různou porozitu v závislosti na koncentraci gelu**

Gely a pohyb částic v nich

- agaróza nebo polyakrylamid
- síťovitá struktura – koncentrace polymeru
- agarózové gely = stovky až 50 kbp
- polyakrylamid = 10 až 1 000 bp



Co musí splňovat gely

- **Homogenní**
- **Inertní, tj. bez nespecifických interakcí**
- **Mechanicky pevné**
- **Transparentní**
- **Reprodukovatelná a snadná příprava**

Výhody elektroforézy

- **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 malými množstvími nebo preparativně v mikrogramových množstvích**
- **Rozdělené molekuly lze snadno prokázat a ve funkční formě izolovat z gelu**

Elektroforéza nukleových kyselin

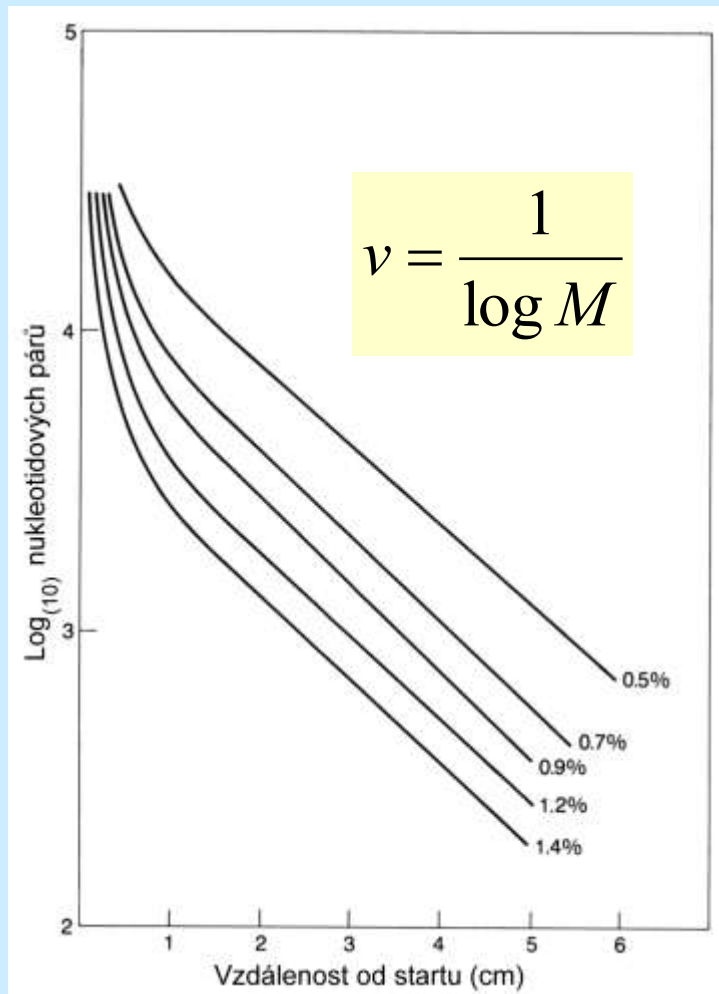
Optimální velikost separovaných molekul

- **agarózové gely 100 bp až 50 000 bp**
- **polyakrylamidové gely 10 až 1 000 bp**

Rychlost pohybu makromolekul

- **je nepřímo úměrná logaritmu velikosti molekul
=> nutné porovnání s velikostními standardy**

Vztah mezi velikostí DNA a pohyblivostí při elektroforéze



Čím menší molekula,
tím dál uběhne



Pohyblivost závisí na
hustotě gelu

Zkuste stanovit



257 bp

**Elektroforézu budeme dělat ve cvičení
a tam si i započítáte, teď si zkuste
velmi jednoduchou úlohu**

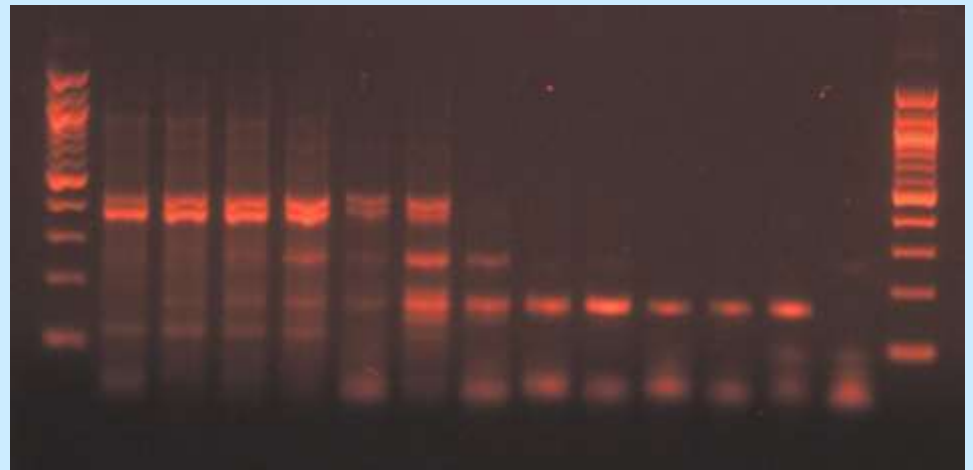
Zadání je zde



**Dokument
ikace Microsoft W**

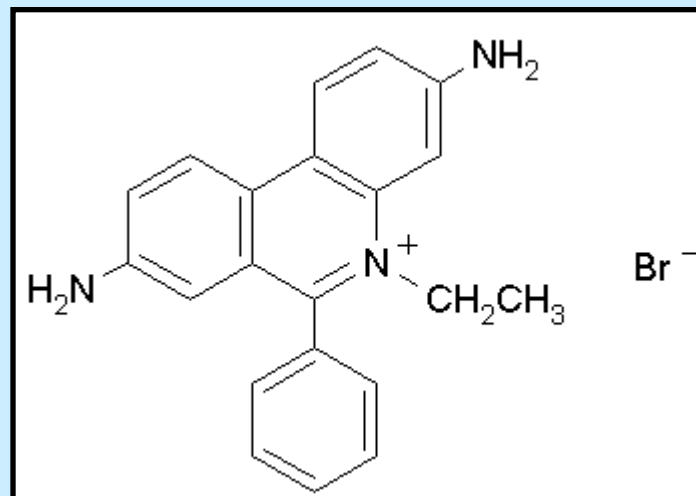
Vizualizace nukleových kyselin

- ethidiumbromid
- SYBR GREEN
- stříbro



UV (256,312nm)

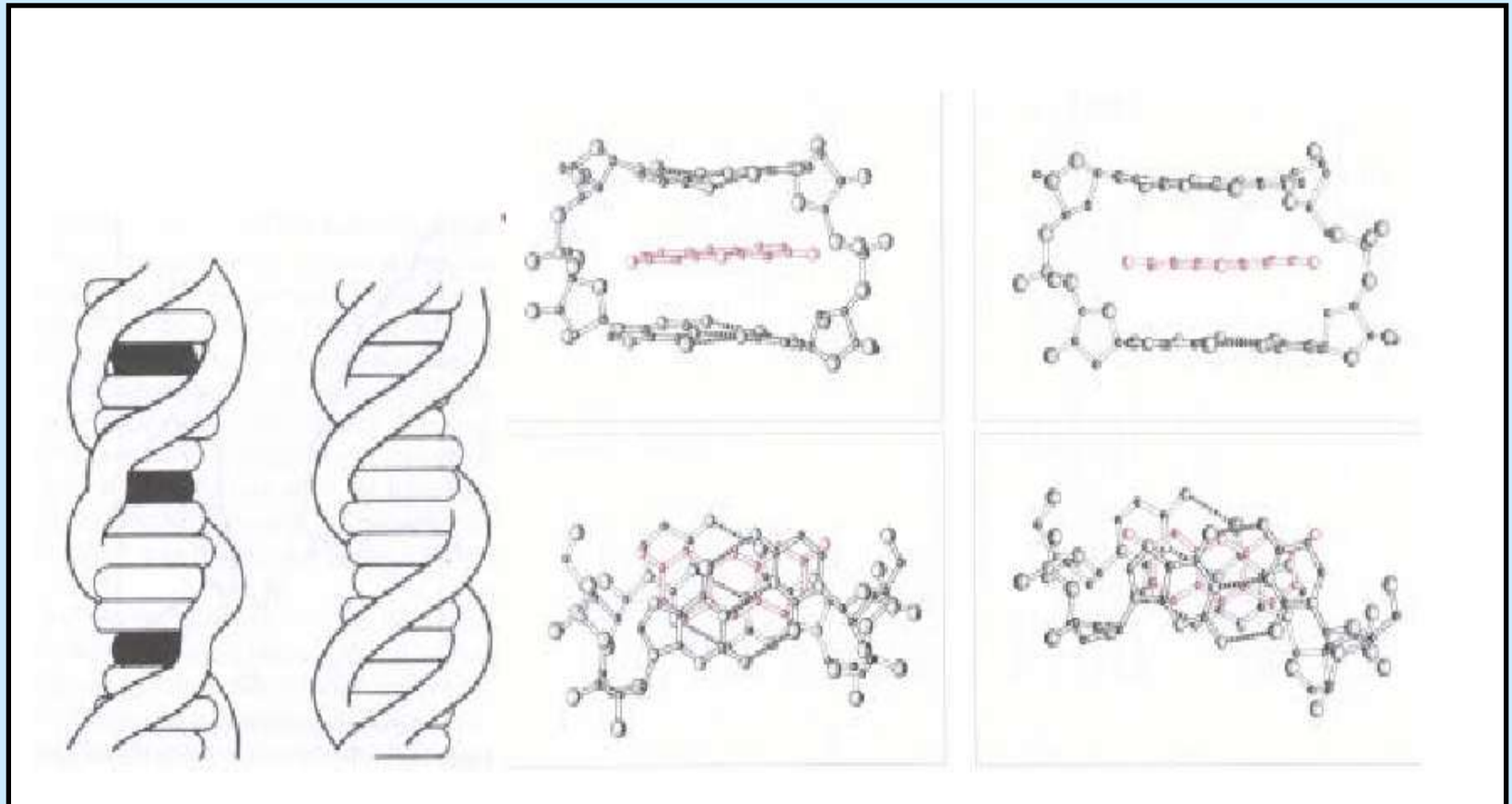
590nm



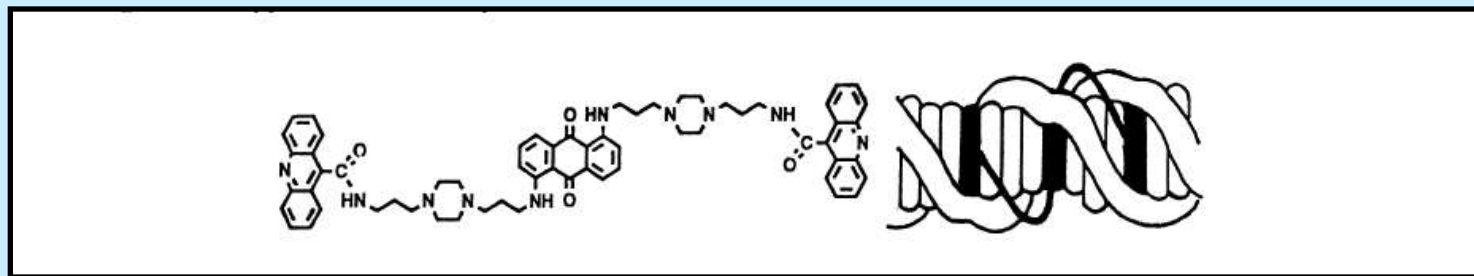
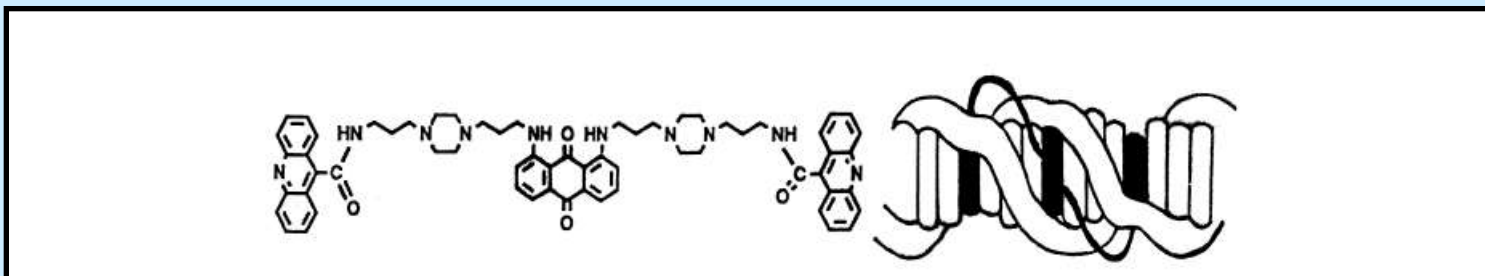
Vlastnosti ethidiumbromidu

- **Váže se jak na DNA, tak i na RNA**
- **Po vytvoření komplexu EtBr-DNA je pozorována ~20 - 30 × vyšší fluorescence**
- **Citlivost 1-5 ng DNA, 5 ng RNA (256 nm)**
- **Polyakrylamid zhasí fluorescenci EtBr, není možné detekovat méně jak 10 ng DNA**

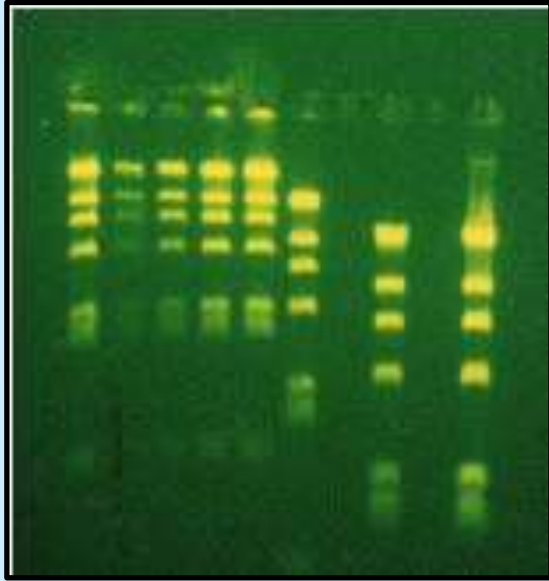
Interkalace ethidiumbromidu



Navlékání interkalátorů



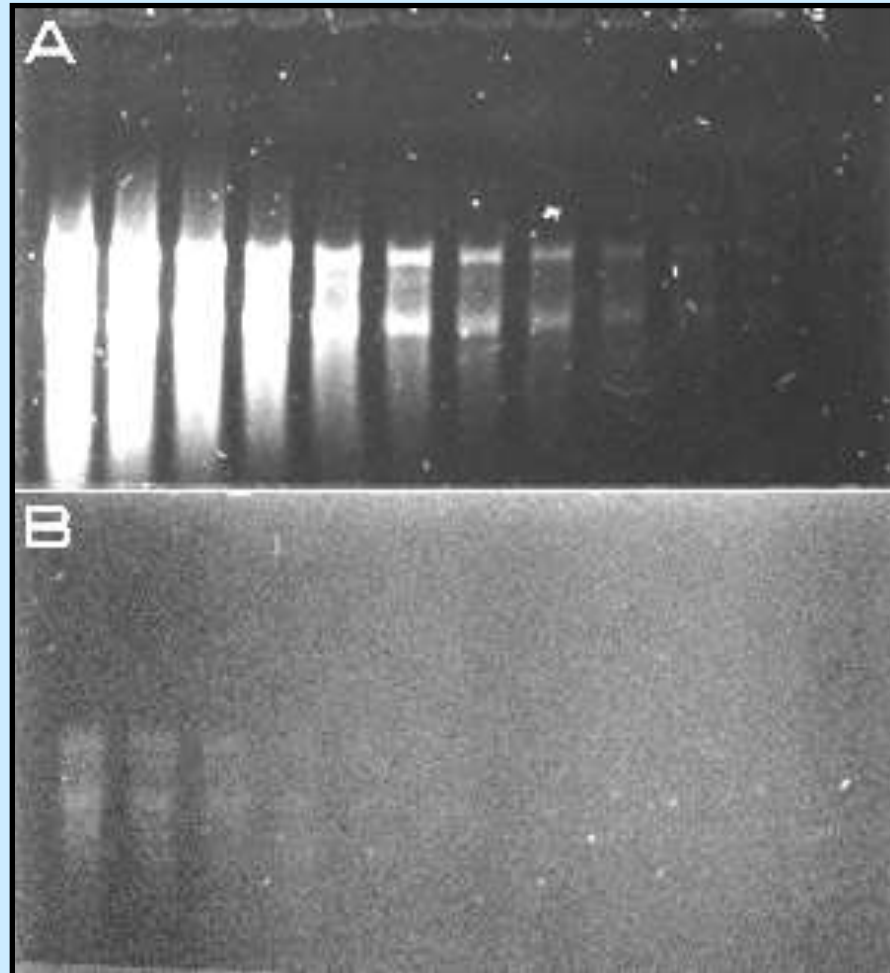
Barvivo SYBR Green I



- vysoká afinita k NA
 - 1000× vyšší fluorescence po vazbě na NA
 - 25 – 100 × citlivější než EtBr
-
- vhodné pro ds DNA, ssDNA a RNA
 - 60 pg dsDNA nebo 1 ng RNA (při 300 nm)
 - mnohem méně mutagenní než EtBr

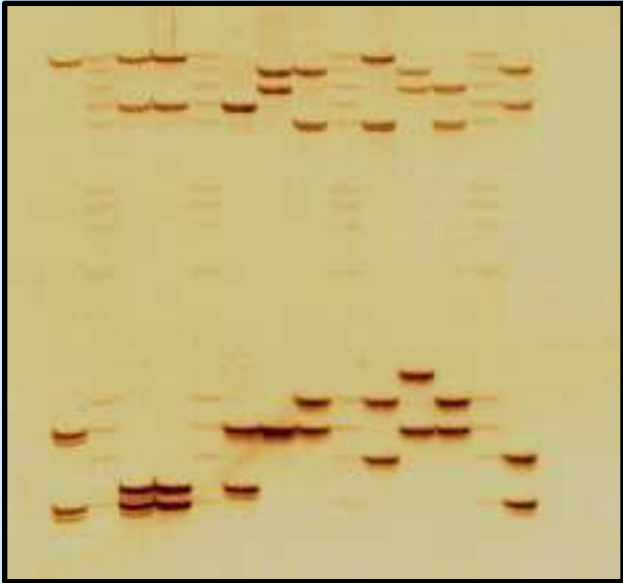
Srovnání citlivosti SYBR Green I a EtBr

SYBR



EtBr

Barvení stříbrem



➤ vhodné pro ds DNA,
ssDNA a RNA

- Barvení NA stříbrem má mírně vyšší citlivost než barvením EtBr
- Lepší citlivost u polyakrylamidových gelů (100 pg DNA) než u agarózových

Využití elektroforézy

- separace molekul
- studium struktury DNA
- studium interakcí mezi NA a proteiny

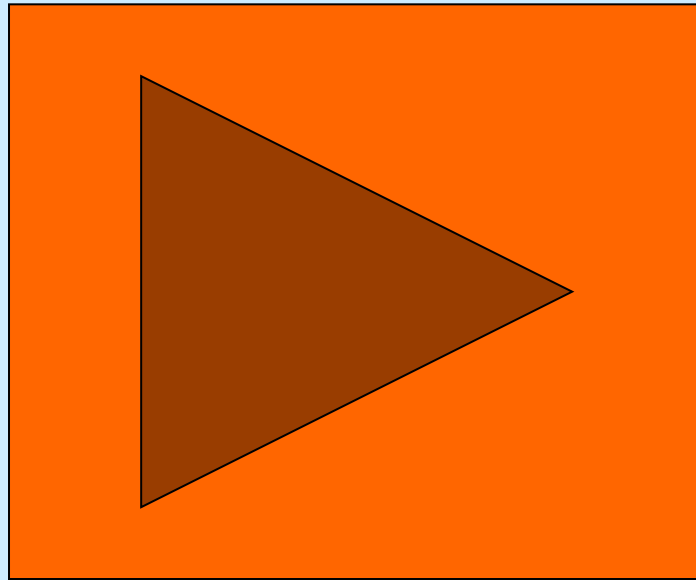


L-forma

CCC-forma

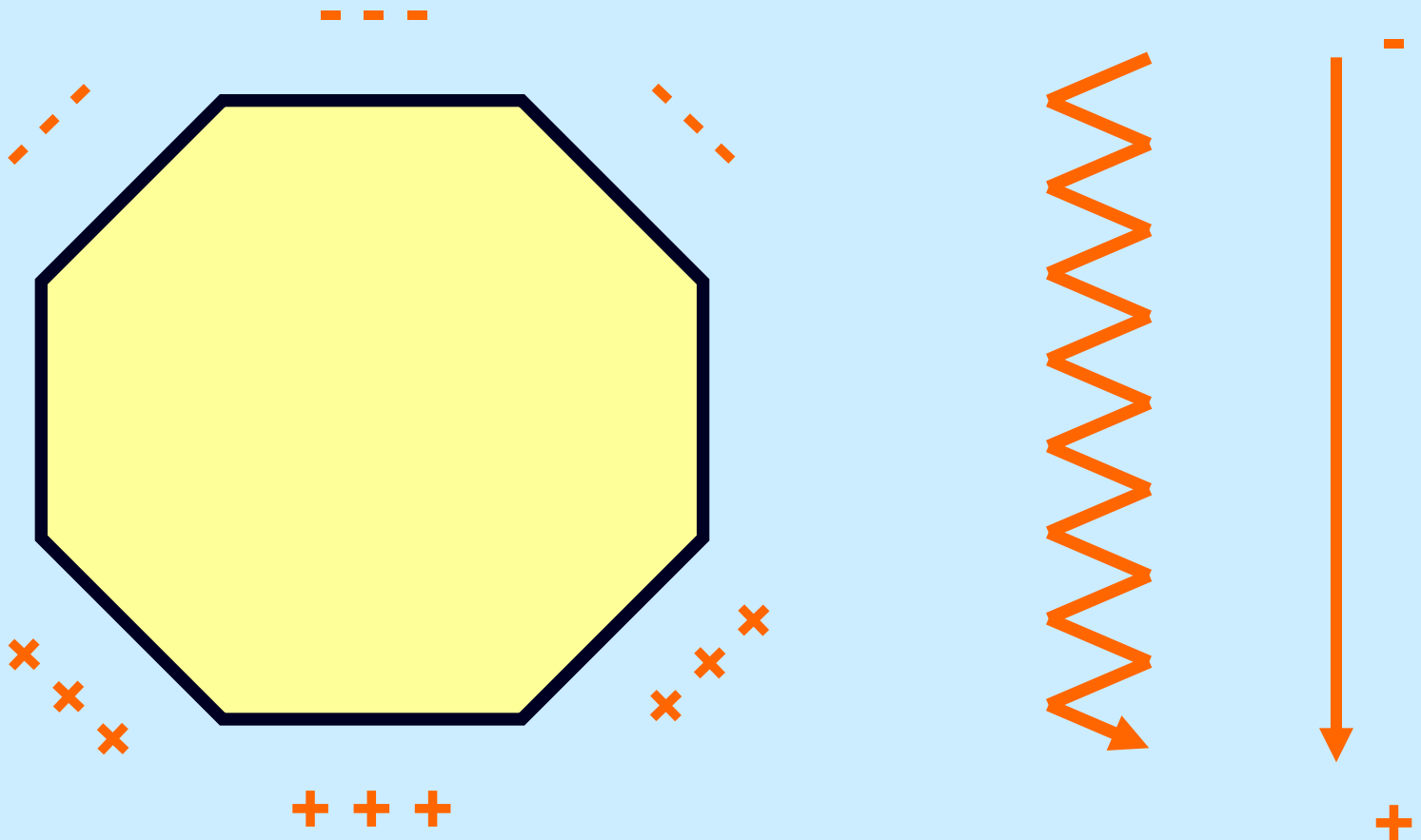
Elektroforéza - animace

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/animations.html>



Pulsní gelová elektroforéza

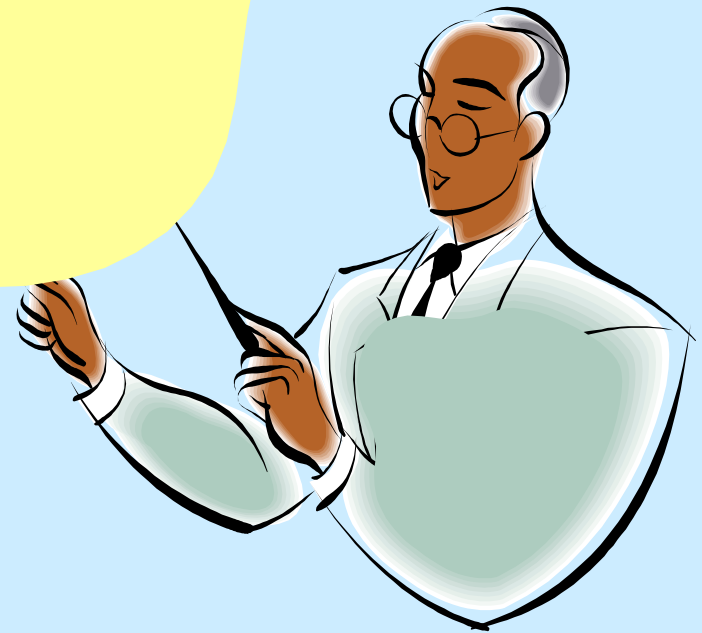
- určena k dělení velkých fragmentů DNA a chromozómů (nad 50 kbp, stovky kbp, megabáze)



Aparatura na PFGE

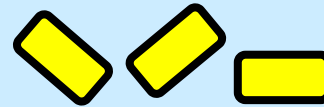


**Pěkná animace znázorňující pohyb
DNA v pulsním poli je na
http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/pulse_field.html**

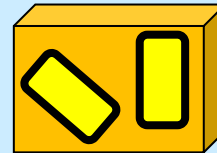


Jak se provádí PFGE

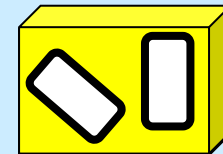
1) Buňky se naředí na vhodnou koncentraci



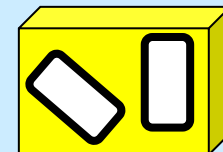
2) Buňky se zalijí do agarózy



3) Agarózové bločky se opracují enzymy – lyze, deproteinace

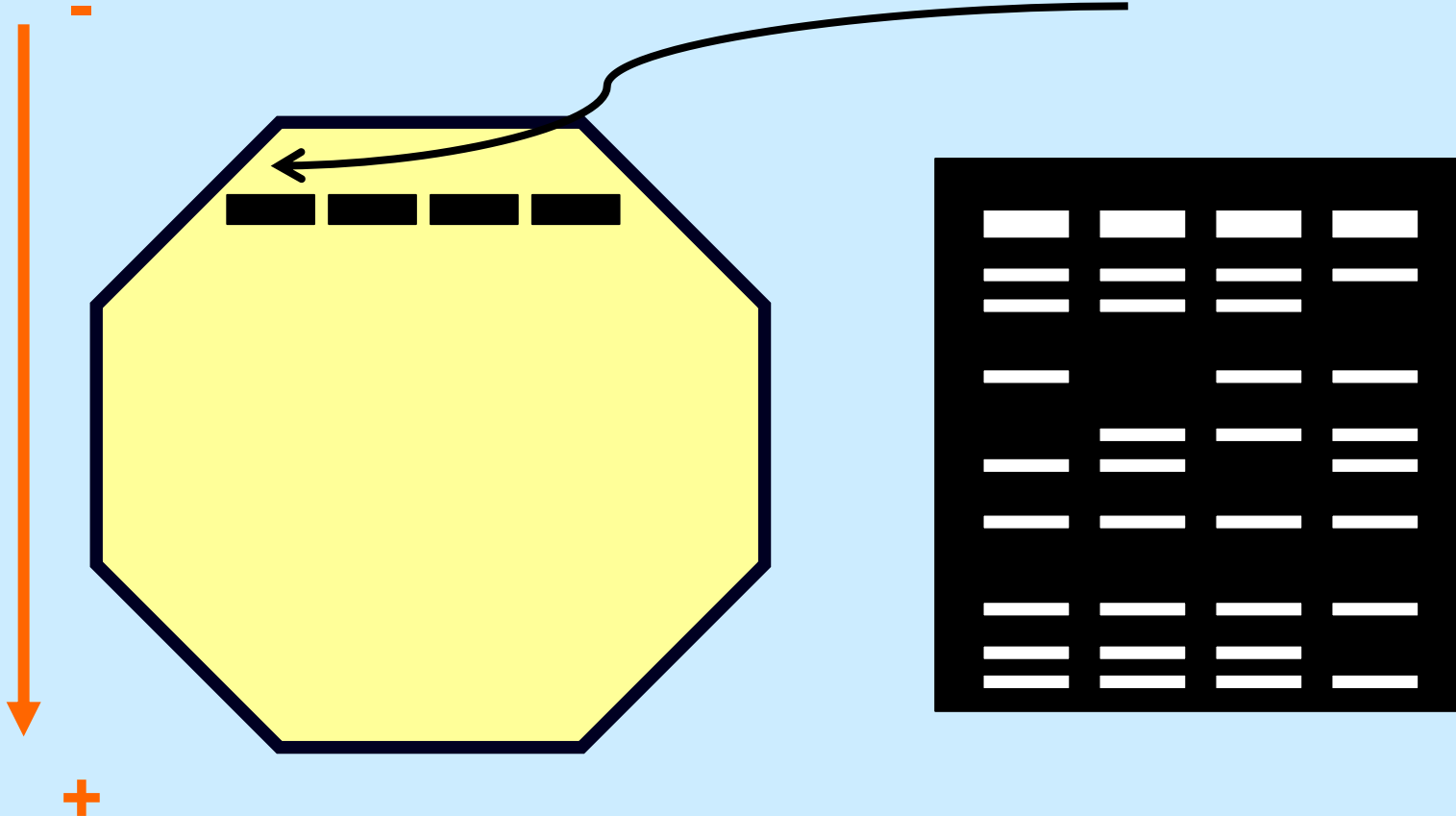
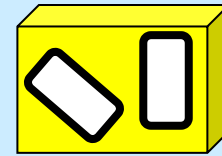


4) Na genomovou DNA v bločcích se aplikují restriktázy



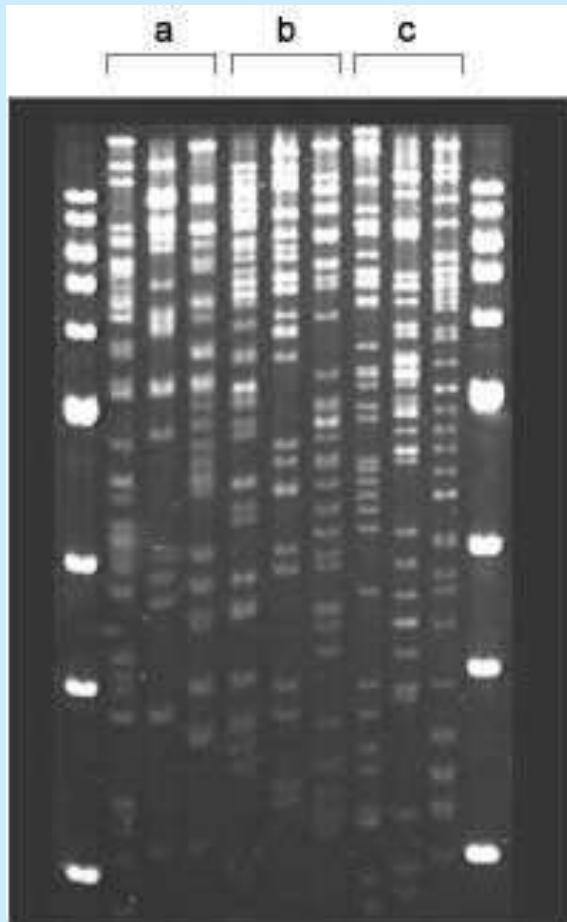
Jak se provádí PFGE

5) Bločky s rozštěpenou genomovou DNA se nanesou na elektroforézu



Příklad aplikace PFGE

Diferenciace mykobakterií po štěpení *NotI*

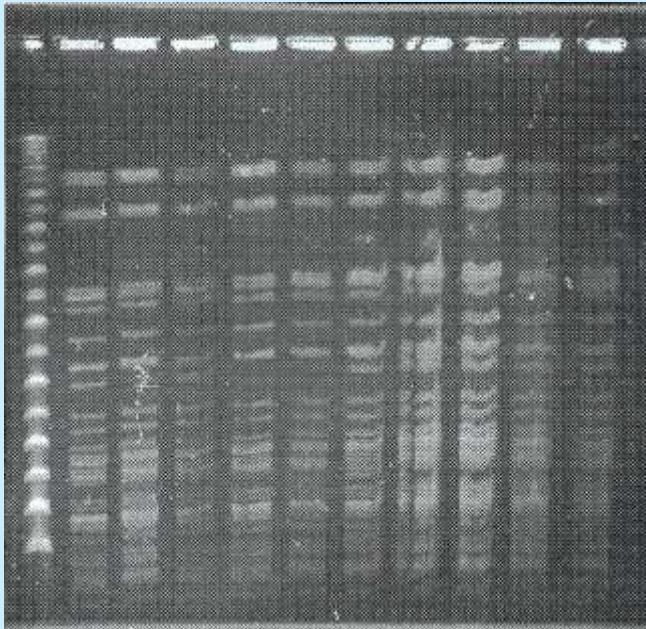


- nástroj pro epidemiology a epizootology
- stanovení fylogenetické příbuznosti
- nezbytná počítačová analýza dat

! porovnej s RFLP !

Jiný příklad aplikace PFGE

Diferenciace *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* po štěpení *SnaBI*, *SpeI*



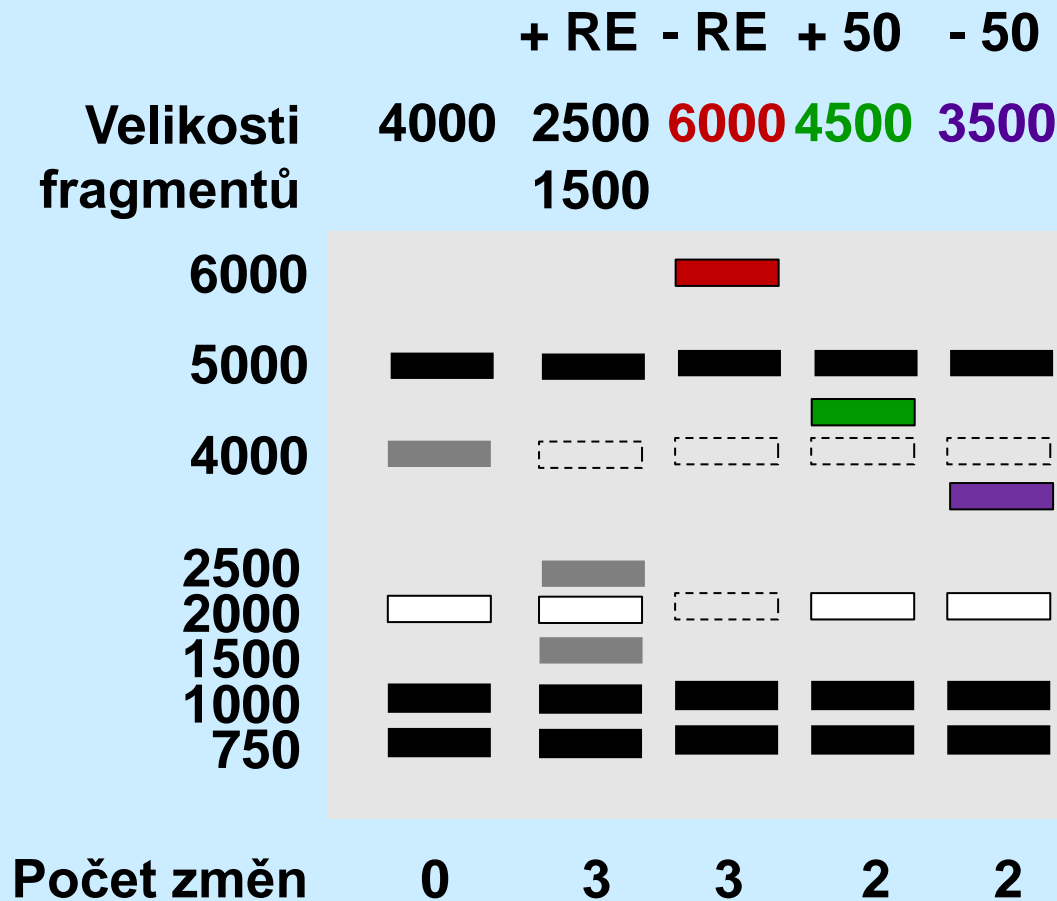
- **Pokus odlišit RFLP typy B-C1**

Diferenciace *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* po štěpení *XbaI*, *DraI*

- **Studium genetické diversity kmenů izolovaných u pacientů s AIDS**

Jak se vyhodnocují fragmenty získané po PFGE?

Analýza změn ve fragmentu 4 000 bp



Vliv mutace na RFLP spektrum

Mutace

Výsledek

- **bodová +RE**
 - **bodová -RE**
 - **inzerce**
 - **delece**
- **ztráta fragmentu + 2 nové**
 - **ztráta 2 fragmentů + 1 větší nový**
 - **stejný počet fragmentů, ale jeden se „prodlouží“ o délku inzerce**
 - **stejný počet fragmentů, ale jeden se „zkrátí“ o délku delece**

Kritéria pro epidemiologii

Kategorie	Počet genetických změn	Počet změn v PFGE	Epidemiologie
Neodlišitelné	0	0	Součást ohniska
Blízce příbuzné	1	2-3	Pravděpodobně (probably) součást ohniska
Asi příbuzné	2	4-6	Možná (possibly) součást ohniska
Odlišné	≥ 3	≥ 7	Mimo ohnisko

Tenover et al. (1995): Journal of Clinical Microbiology 33 (9), 2233-2239

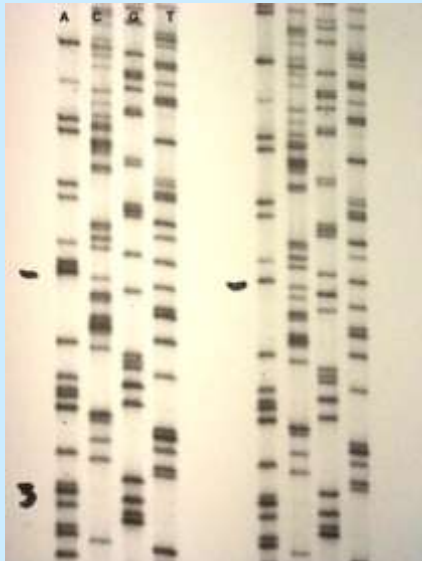
Denaturační gelová elektroforéza

- V přítomnosti **denaturačního činidla** (formamid, močovina) během elektroforézy DNA zvolna denaturuje
- Vznikají lokální větvené struktury s **jednořetězcovou strukturou**
- Stejně dlouhé molekuly o různé sekvenci vytvářejí rozdílné struktury a pohybují se různou rychlostí
- Lze dosáhnout **detekce rozdílů až jediného bp**

Podobný efekt má gradient teploty

Elektroforéza se uplatňuje při sekvenování nukleových kyselin

- desítky až stovky párů bazí
- denaturující polyakrylamidové gely (močovina)
- moderní metody využívají kapilární gelové elektroforézy



Existuje taky elektroforéza proteinů

- polyakrylamidové gely denaturující a nedenaturující
- různé způsoby detekce – Comassie brilliant blue, stříbro

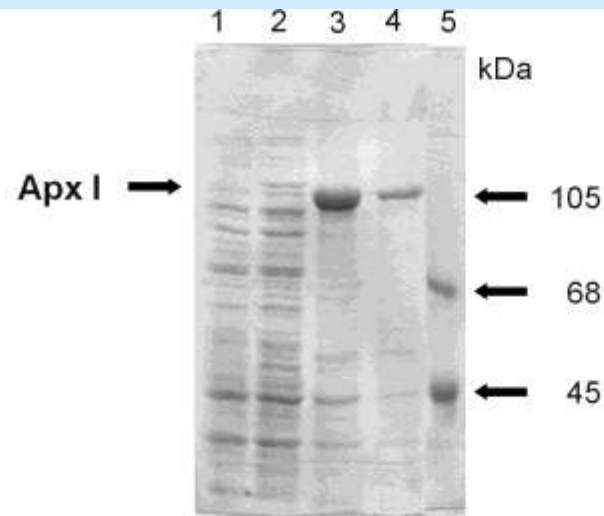


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of recombinant Apx I produced by *E. coli*. Lane 1: 20 ul aliquot of culture lysate before induction and 3 hours after IPTG induction (lane 2), lane 3: 20 ul aliquot of inclusion bodies from 3 hours cultured cells OD = 100 and OD = 20 (lane 4), lane 5: MW marker.

**Více si o elektroforéze
proteinů řekneme ke konci
semestru**



Příklady využití elektroforézy



Jsou obsahem přednášky pro 5. ročník

- **Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)**
- **Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)**
- **Polymorfismus délky fragmentů DNA vytvořených cleavázou (CFLP)**
- **Polymorfismus konformace jednořetězců (CSCP)**
- **Polymorfismus konformace dvouřetězců (DSCP)**

A tak to někdy taky chodí ...



A tak to někdy taky chodí ...



A tak to někdy taky chodí ...



A tak to někdy taky chodí ...



A tak to někdy taky chodí ...



A tak to někdy taky chodí ...



A tak to někdy taky chodí ...



Shrnutí

- 1) Elektroforéza – základní informace**
- 2) Typy elektroforéz**
- 3) Stanovení velikosti fragmentů elektroforézou**
- 4) Různé typy barvení gelů**
- 5) Pulsní gelová elektroforéza**
- 6) Denaturační elektroforéza**
- 7) Kapilární elektroforéza**

