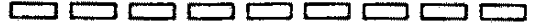
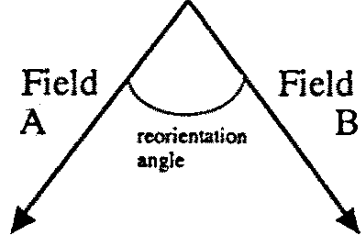


Pulzní gelová elektroforéza

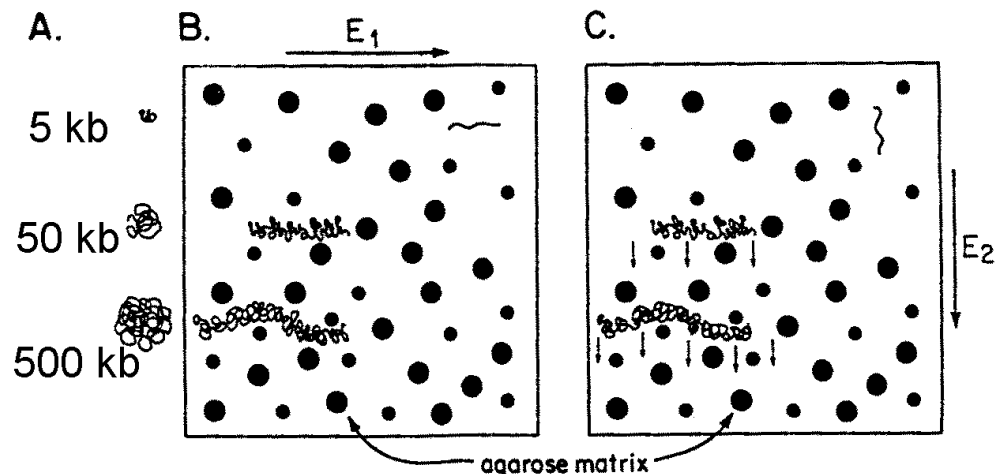
- Při konvenční gelové elektroforéze je rozdělení molekul je podmíněno rychlejším průchodem menších molekul pórovitou strukturou gelové matrice.
- Tento princip separace se uplatňuje u molekul DNA do velikosti přibližně 50 kb.
- Větší molekuly se pohybují stejnou rychlostí a nerozdělí se.
- K jejich 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.

Základní termíny týkající se PFGE

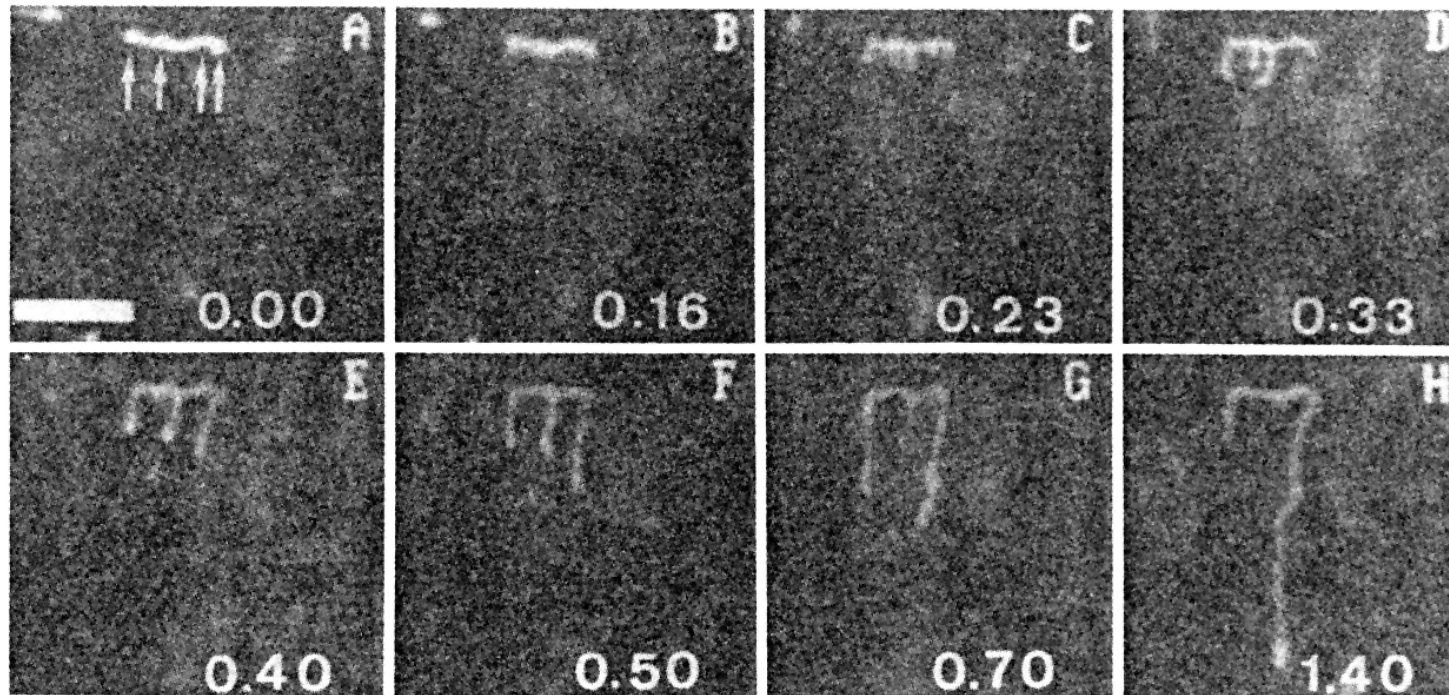
- **Pulzní pole** (pulsed field).
Elektroforetický proces, který používá více než jedno elektrické pole, a ve kterém se elektrická pole střídavě aktivují.

- **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.



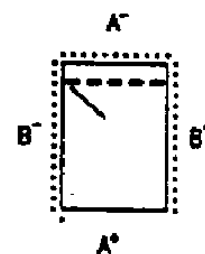
Pohyb DNA v agarózovém gelu při PFGE



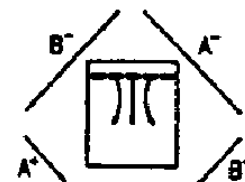
Označení systémů používaných pro pulzní elektroforézu

- **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

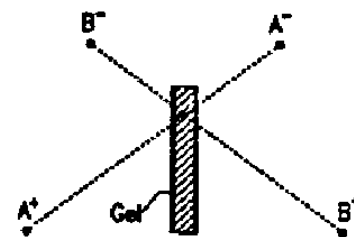
PFGE



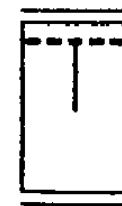
OFAGE



TAFE



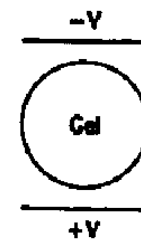
FIGE



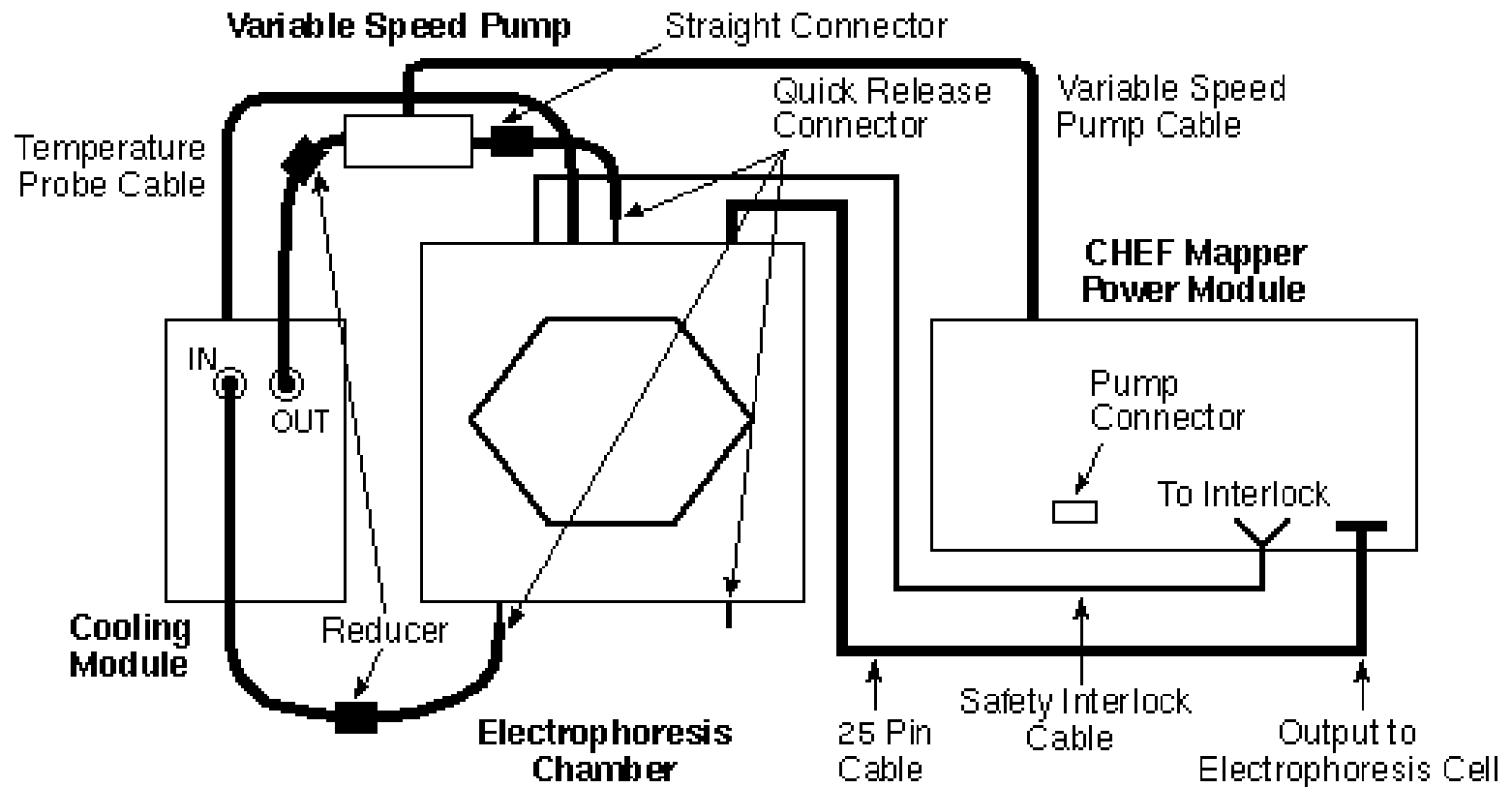
CHEF



RGE



Součásti aparatury pro PFGE



Příprava vzorků pro PFGE

- Kultivace buněk do přesně stanovené hustoty
- Smíchání buněk s roztavenou agarózou (10^7 buněk/ml)
- Nalítí směsi do malé formičky
- lyze buněk v agarózových bločcích
- deproteinace DNA
- Promytí a odstranění proteinázy K (fenyl-metyl sulfonyl fluorid, PMSF)
- Štěpení restriční endonukleázou, která štěpí s nízkou frekvencí (velikost fragmentů 50 - 10 000 kbp)
- Vlastní PFGE 5- 10 μ g DNA v jamce
- Barvení gelu v etidiumbromidu

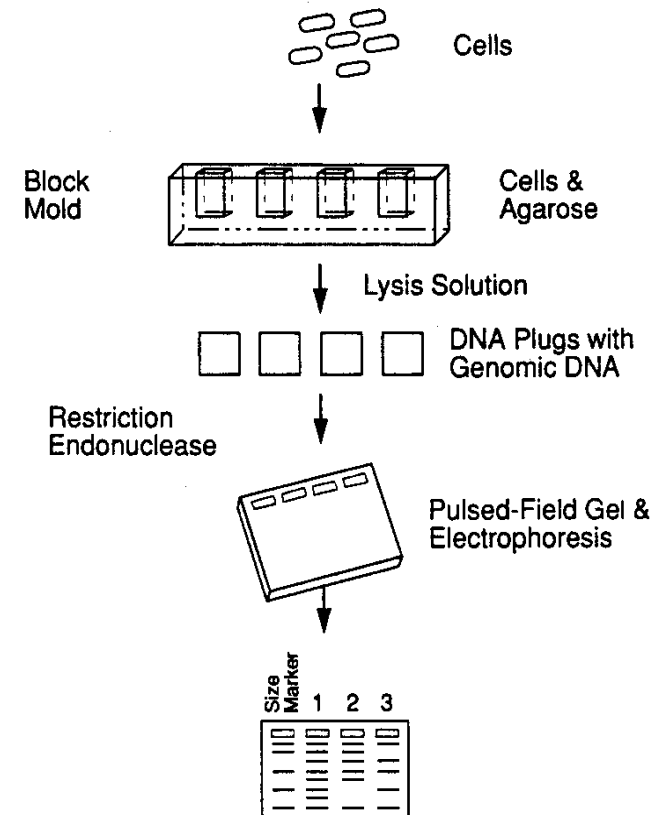
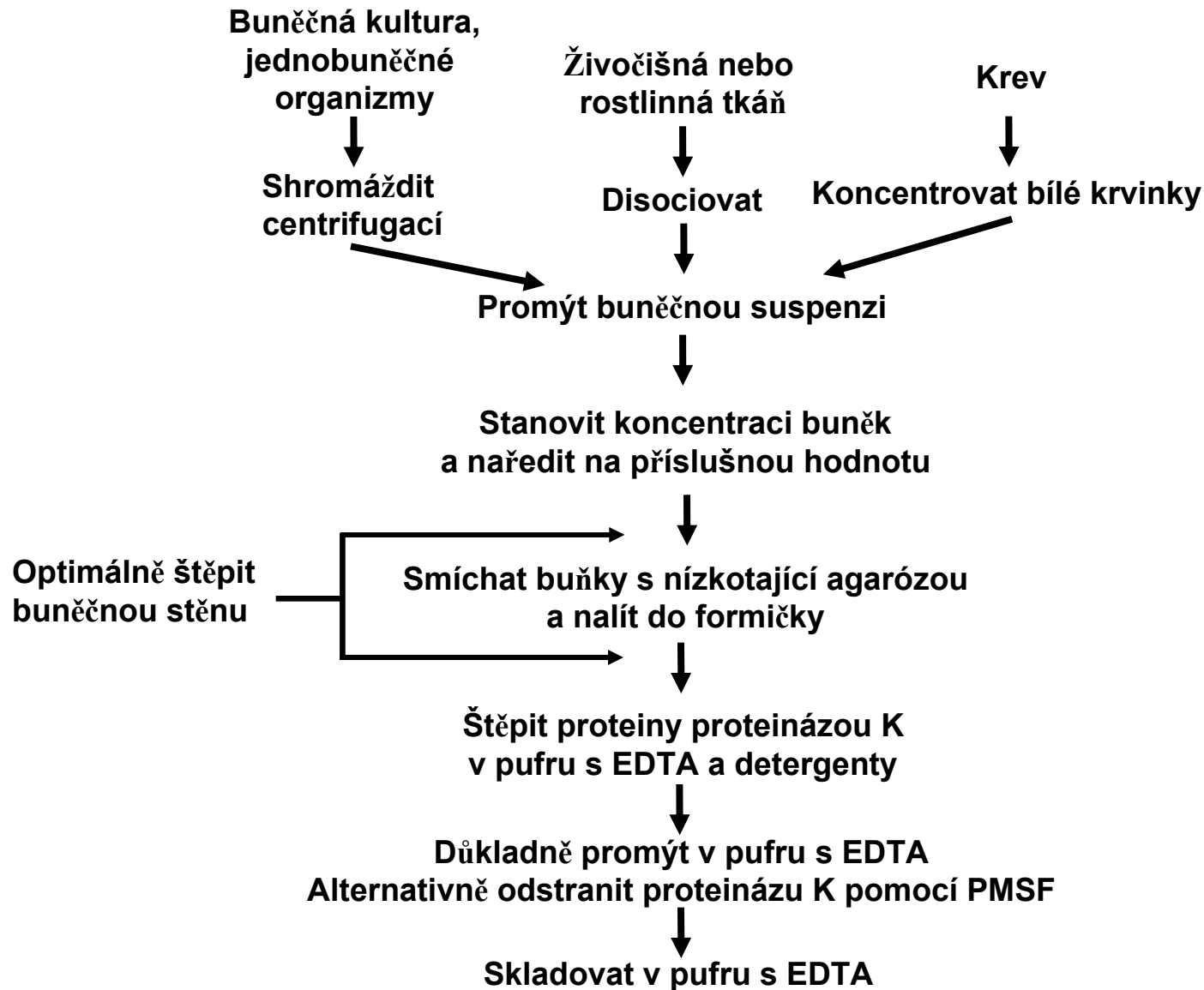


Schéma přípravy vzorků pro PFGE



Výběr vhodných restričních enzymů pro makrorestriční analýzu DNA

1. Výběr na základě délky rozpoznávací sekvence RE

Délka rozpoznávací sekvence by měla být ≥ 6 bp

SfiI 5' GGCCN↓NGGCC 3' příklad RE s 10 bp rozpoznávací sekvencí

I-SceI 5' TAGGG↓ATAA↑CAGGGTAAT 3' příklad intronem kódované endonukleázy s 18 bp dlouhou rozpoznávací sekvencí

2. Výběr na základě obsahu GC

Bakteriální druhy se velice liší v obsahu GC v jejich genomech.

Enzymy s GC-bohatou rozpoznávací sekvencí jsou vhodné pro AT-bohaté genomy

SmaI 5' CCC↓GGG 3' *NotI* 5' GC↓GGCCGC 3'

a enzymy s AT-bohatou rozpoznávací sekvencí jsou vhodné pro GC-bohaté genomy.

SspI 5' AAT↓ATT 3' *SwaI* 5' ATTT↓AAAT 3'

3. Výskyt určitých sekvenčních motivů v rozpoznávací sekvenci

Přítomnost sekvence odpovídající terminačnímu kodonu v rozpoznávacím místě RE může ovlivnit frekvenci štěpení.

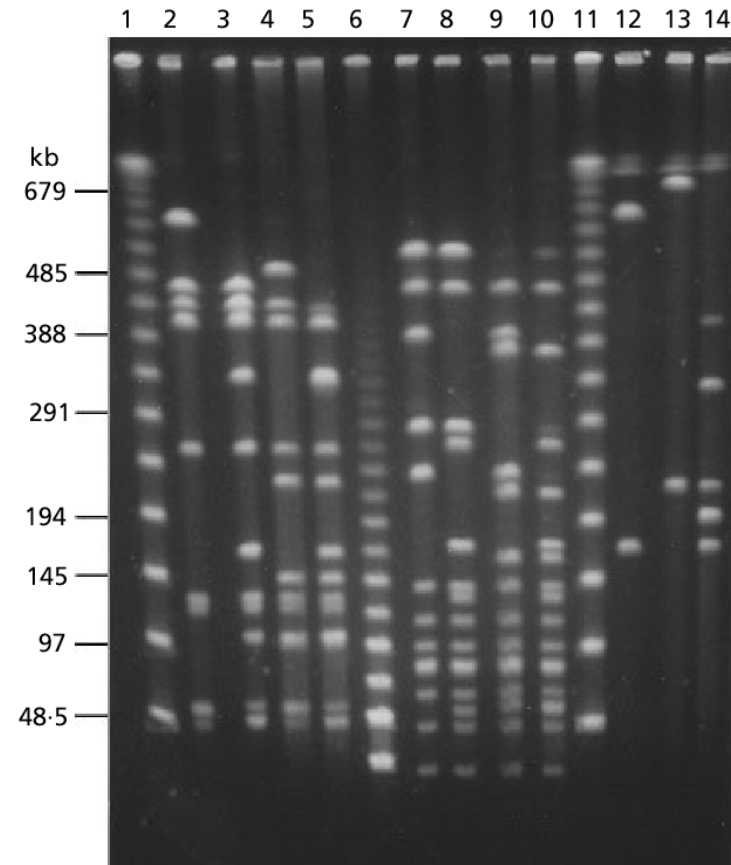
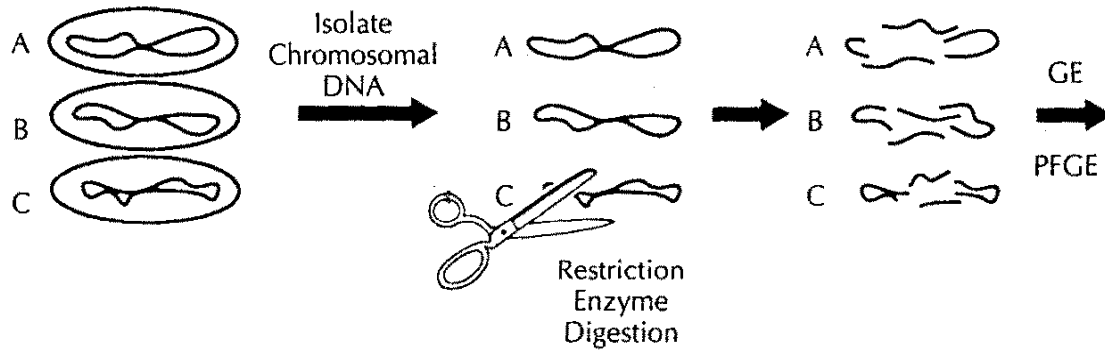
XbaI 5' T↓CTAGA 3' amber

4. Restriční endonukleázy citlivé na metylaci typu CpG jsou vhodné eukaryotické DNA

Některé enzymy neštěpí DNA jestliže se v rozpoznávacím místě vyskytuje 5-metylcytozin.

MluI 5' A↓C*GC*GT 3' tento enzym štěpí savčí DNA méně často než *SfiI*

Využití PFGE pro diagnostické a typizační účely – makrorestrikční analýza



Interpretace výsledků PFGE při typizaci bakterií

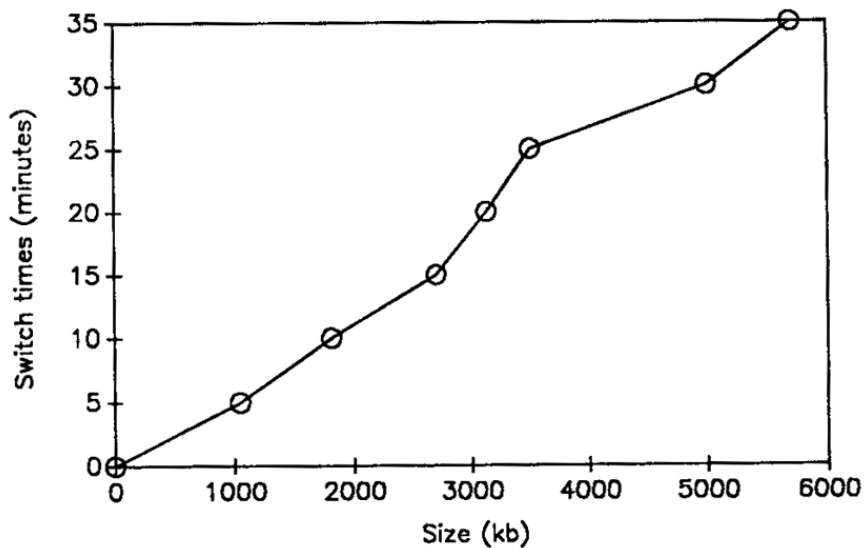
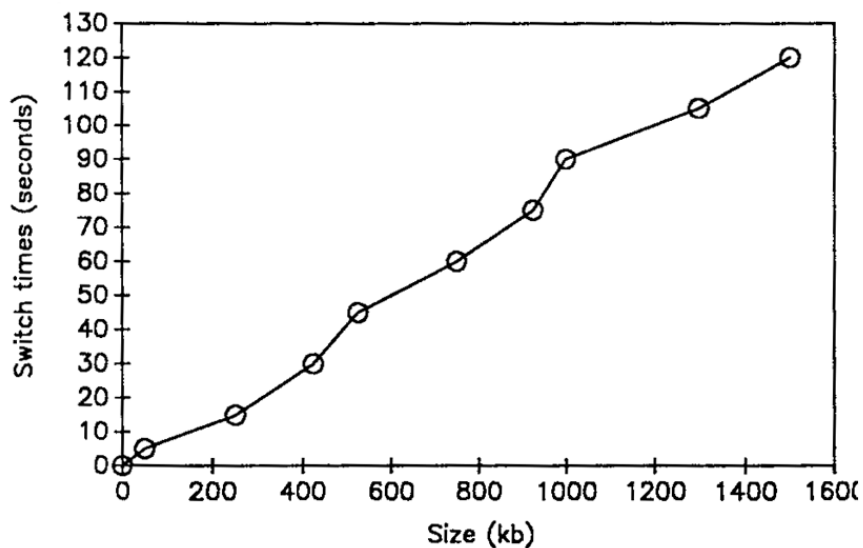
Typ genetické změny	Původní počet fragmentů	Výsledek v PFGE ve vztahu k standardnímu kmeni	Výsledný počet fragmentů
Bodová mutace tvorba RE-místa	5	Ztráta 1 fragm. standardního kmene, vznik 2 menších fragm. (suma velikostí se rovná velikosti fragm. st. kmene) 3 rozdíly ve fragmentech	6
Bodová mutace ztráta RE-místa	5	Vznik nového většího fragm., nepřítomného u st. kmene a ztráta 2 malých fragm. 3 rozdíly ve fragmentech	4
Inzerce fragm. DNA bez RE-místa	5	Počet fragm. stejný, vznik většího fragm. 2 rozdíly ve fragmentech	5
Delece fragm. bez RE-místa	5	Počet fragm. stejný, vznik menšího fragm. 2 rozdíly ve fragmentech	5

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu při PFGE

1. *Velikost molekuly DNA*
2. *Koncentrace gelu*
3. *Konformace DNA*
4. *Aplikovaná voltáž (V/cm)*
5. *Teplota*
6. *Směr elektrického pole a reorientační úhel*
7. *Pulzní intervaly*
8. *Složení elektroforetických pufrů*

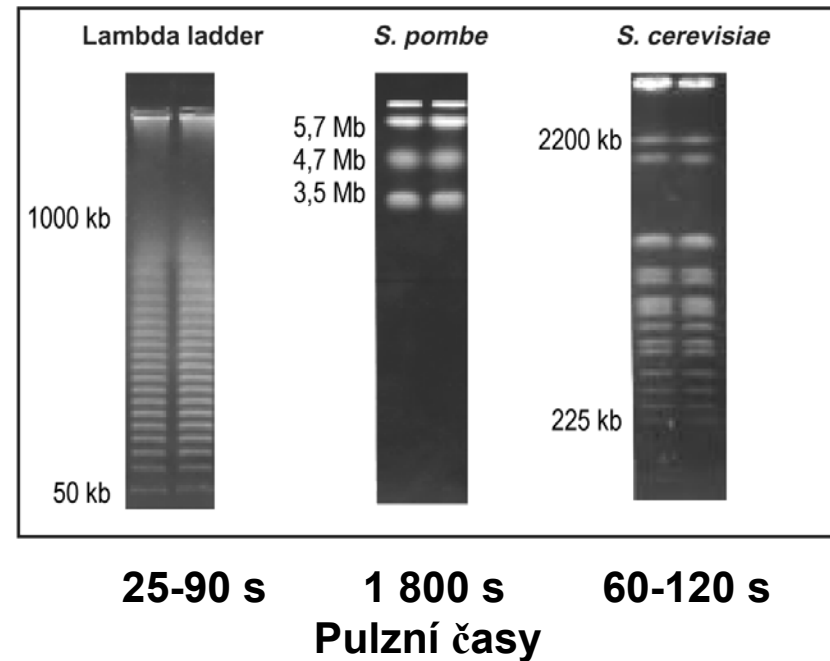
Volba pulzních intervalů v závislosti na velikosti separovaných molekul

přesné hodnoty je možno určit pomocí softwaru



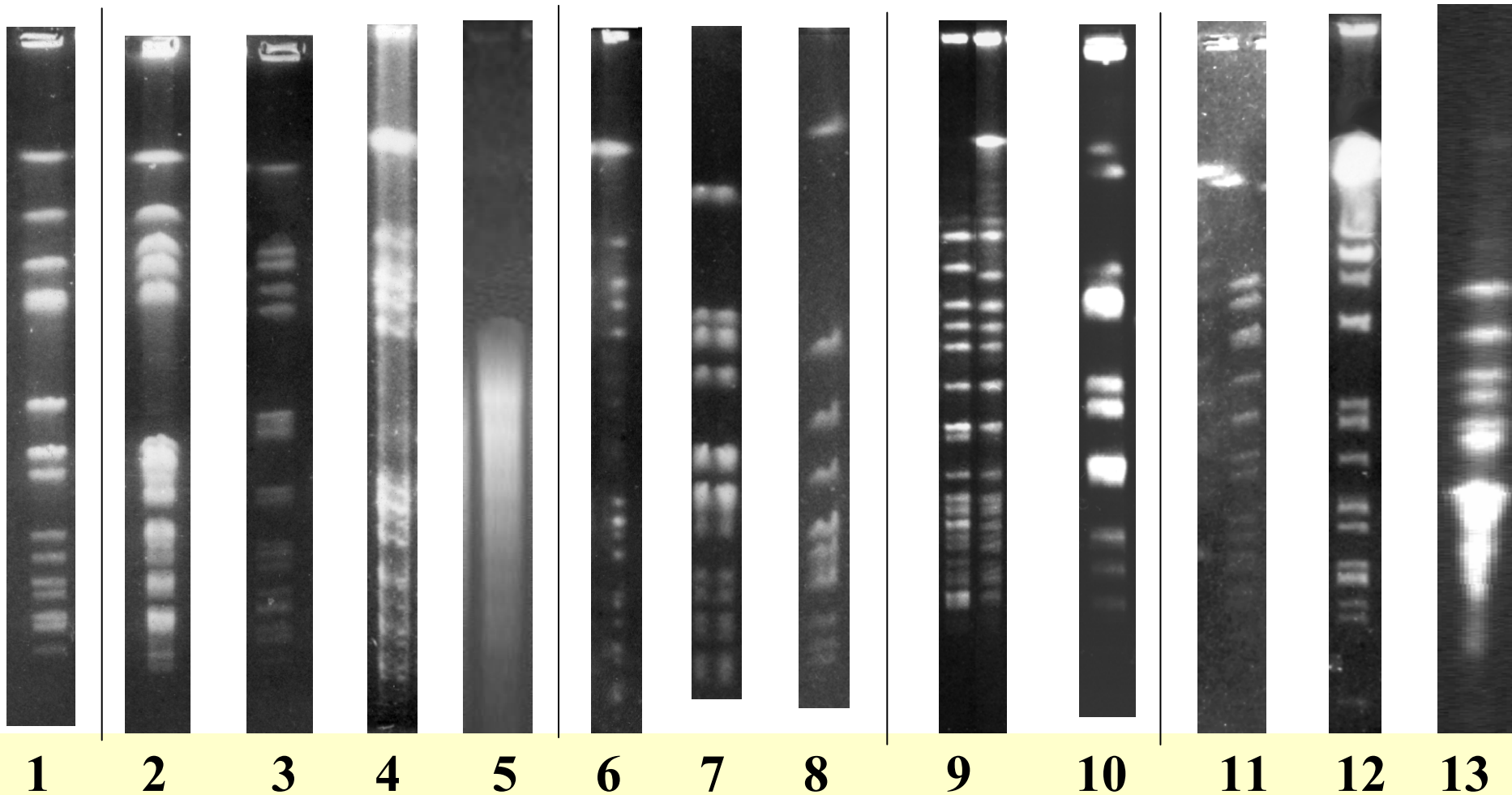
Používané standardy velikostí pro PFGE

- 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)



Problémy při PFGE

Problémy při izolaci – nanášení vzorku – štěpení RE – nastavení PFGE



1. Optimální vzorek
2. Vysoká koncentrace buněk
3. Nízká koncentrace buněk
4. Nedokonalé promíchání buněk s agarózou
5. Degradace DNA při izolaci nebo štěpení
6. Bloček agarózy je v jamce vertikálně
7. Bloček se během nanášení rozlomil
8. Bloček je v jamce umístěný zešikma
9. Částečné štěpení DNA (vzorek vpravo)
10. Částečné štěpení DNA v části bločku vyčnívající z pufru
11. Nedostatečné chlazení nebo není vodorovná podložka
12. Příliš krátké pulzní intervaly
13. Příliš dlouhé pulzní intervaly