

Gelová elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza je jednou ze základních metod molekulární biologie. Tato standardní metoda se používá k separaci, identifikaci a purifikaci fragmentů DNA. Jako nosiče se nejčastěji používá agaróza nebo polyakrylamid.

Elektroforéza DNA je používána jak k analytickým účelům (tj. stanovení velikosti nebo konformace), tak k preparativním účelům (separace DNA podle velikosti a následná izolace požadované frakce).

Pohyb DNA během elektroforézy je ovlivněn řadou parametrů, z nichž nejdůležitější jsou:

a) Velikost molekuly DNA: čím větší molekula, tím pomaleji se v gelu pohybuje. Lineární dsDNA se pohybují v gelech rychlostí, která je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti (bp).

b) Koncentrace gelu jsou dle velikosti fragmentů :

Obsah agarózy v gelu (%)	Rozsah efektivního dělení DNA (kb)
0,3	60 - 5
0,5	30 - 1
0,6	20 - 1
0,7	10 - 0,8
0,8	9 - 0,7
1,0	7 - 0,5
1,2	6 - 0,4
1,5	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

Molekuly DNA nad 20 kb nelze standardní elektroforézou navzájem oddělit; v těchto případech se používá pulzní gelová elektroforéza, kterou lze oddělit DNA až do velikosti několika Mb.

c) Rychlost pohybu je závislá na konformaci DNA. Různé formy DNA (ccc, oc a lineární) se pohybují různou rychlostí.

d) Intenzita elektrického pole: při nízkém napětí je rychlost pohybu přímo úměrná napětí. Zvyšování napětí vede k nelineárnímu zvýšení rychlosti pohybu a oblast efektivního rozdělení se snižuje - proto nemá napětí převyšovat hodnotu 5 V/cm.

e) Teplota a zastoupení bází v DNA. Elektroforetické chování DNA v agarózových gelech (na rozdíl od polyakrylamidových gelů) není významně ovlivněno zastoupením bází nebo teplotou, při které probíhá elektroforéza. Nejčastěji se elektroforéza provádí při pokojové teplotě; při použití gelů o nízké koncentraci se teplota udržuje na nižších hodnotách (4 - 10 °C).

Z hlediska experimentálního uspořádání se rozlišuje horizontální elektroforéza, při níž je gel umístěn v elektroforetické vaně ve vodorovné poloze a vertikální elektroforéza, při níž je gel uložen ve svislé poloze.

Elektroforetické pufrů

Nejběžnější používané jsou:

- TRIS-acetátový (TAE): 0,04 M Tris-acetát, 0,002 M EDTA, pH 8,2
- TRIS-fosfátový (TPE): 0,08 M Tris-fosfát, 0,008 M EDTA
 - TRIS-borátový (TBE): 0,089 M Tris-borát, 0,089 M kyselina boritá, 0,002 M EDTA

Příprava Tris-acetátového pufru (50× koncentrovaný zásobní roztok)

242 g Tris báze

57,1 ml ledové kyseliny octové

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

H₂O doplnit do 1000 ml. Výsledné pH je 8,2.

Příprava agarózového gelu

V Erlenmayerově baňce připravíme 0,8 % roztok agarózy v TAE pufru:

1. K odměřenému množství pufru (změříme rozměry zařízení na nalévání gelu a vypočteme množství roztoku agarózy potřebného k přípravě gelu o výšce 0,5 cm) přidáme správné množství práškové agarózy.
2. Agarózu necháme v tlakovém hrnci rozvařit 10 - 15 min.
3. Roztok zchladíme na 50 °C a nalejeme do zařízení na tvorbu gelu, které je umístěno na vodorovném podkladu. Zkontrolujeme, zda mezi podložkou a hřebínkem je 0,5 - 1 mm agarózy.
4. Necháme gel zchladnout 30 - 45 min (podle okolní teploty).
5. Po utuhnutí agarózy převrstvíme gel TAE pufrům a opatrně vytáhneme hřebínek.

Nanesení vzorku do agarózového gelu a provedení elektroforézy

1. Vzorek DNA naředíme TE pufrům tak, aby koncentrace DNA byla v rozmezí 0,5 - 1 µg/10 µl. 10 µl vzorku smícháme se 2 µl nanášecího pufru (v Eppendorfově zkumavce nebo na proužku Parafilmu) a pomocí automatické pipety nanese do otvoru v gelu, který jsme předtím převrstvili elektroforetickým pufrům.

Nanášecí (barvicí pufr) 6× koncentrovaný:

0,25 % bromfenolová modř

40 % (w/v) sacharóza ve vodě

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

2. Přeneseme gel do elektroforetické vany a doplníme elektroforetický pufr tak, aby překrýval gel přibližně 3 mm. Nastavíme hodnoty napětí nebo proudu a necháme probíhat elektroforézu tak dlouho dokud barvivo neurazí vzdálenost alespoň 3/4 délky gelu.
3. Po ukončení elektroforézy přeneseme gel do barvicí lazně (TAE pufr obsahující 1 µg etidumbromidu/ml) a barvíme 0,5 až 1 hod.

Pozn.: Etidumbromid se interkaluje mezi báze v dvouřetězcové DNA a po ozáření UV světlem fluoreskuje 80× intenzivněji než samotné barvivo. Tímto způsobem lze detekovat 1 - 5 ng DNA. Etidumbromid je silný mutagen. Při práci s jeho roztoky je nutné pracovat v rukavicích a dodržovat zásady bezpečnosti!
4. Gel opláchneme vodou a fotografujeme pod UV světlem 302 nm.

Příprava agaróзовého gelu

