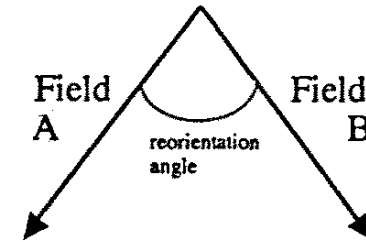


Pulzní gelová elektroforéza

- 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.

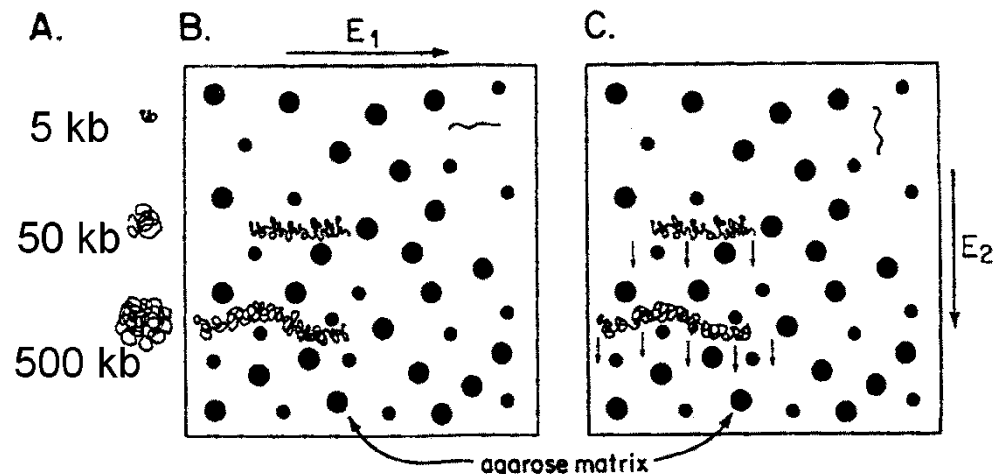
Základní termíny týkající se PFGE

- **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.

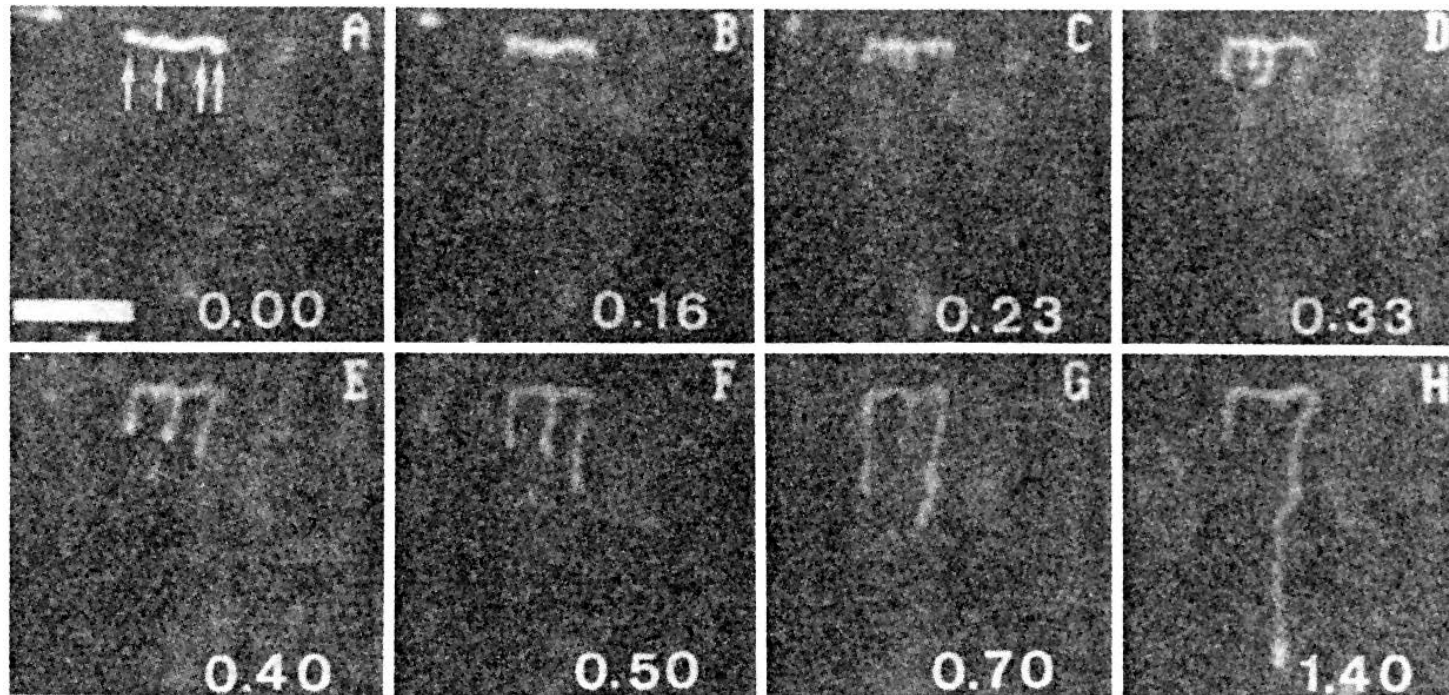


Princip separace molekul v pulzním poli

- 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.



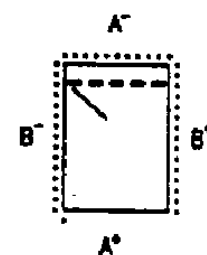
Pohyb DNA v agarózovém gelu při PFGE



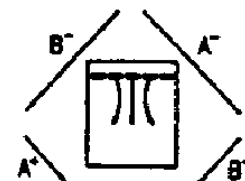
Označení systémů používaných pro pulzní elektroforézu

- **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

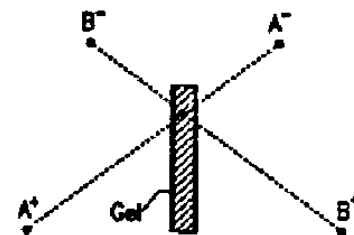
PFGE



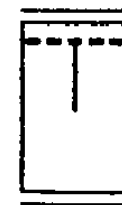
OFAGE



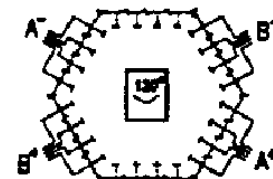
TAFE



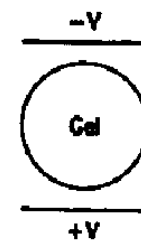
FIGE



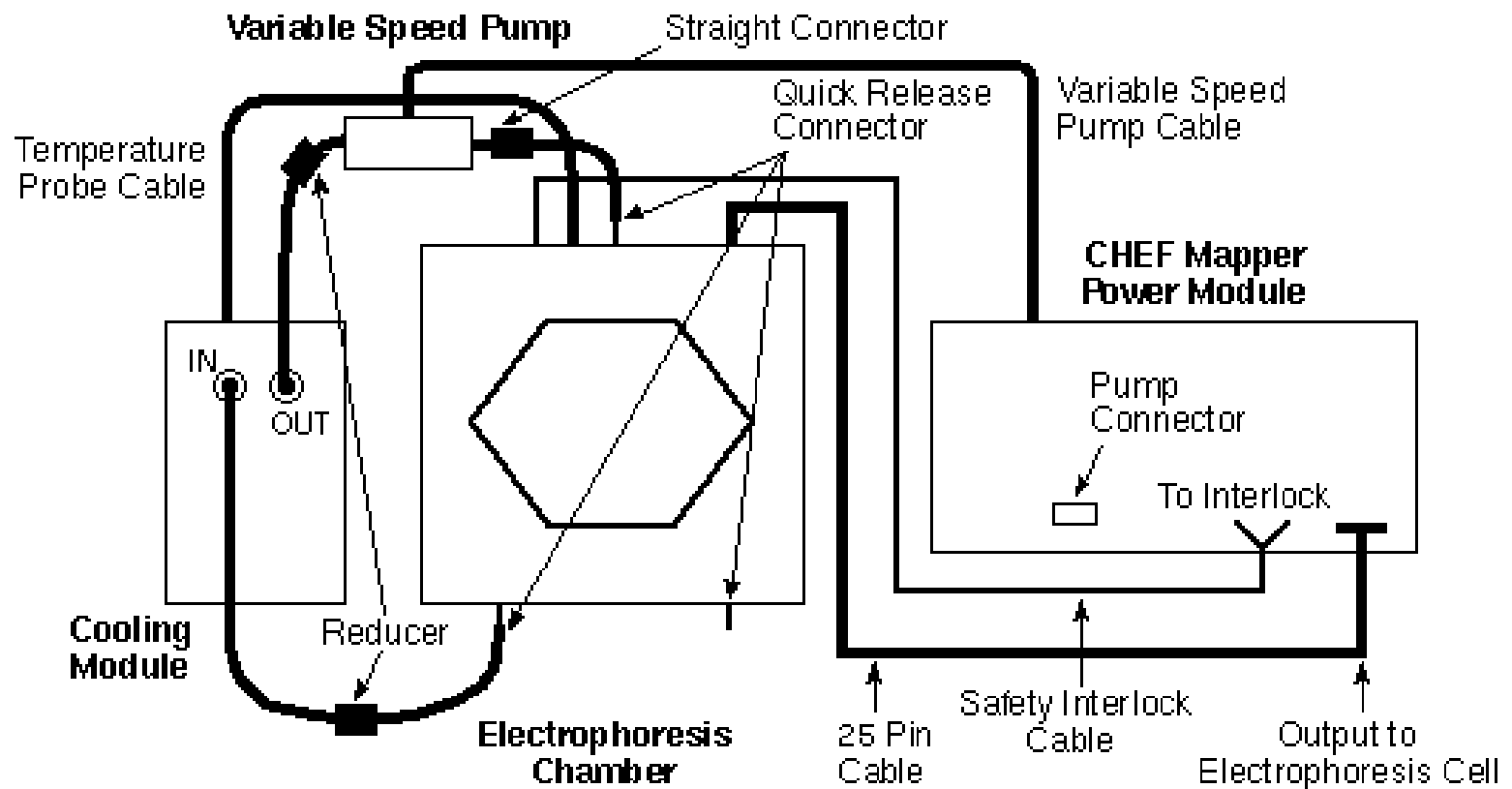
CHEF



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

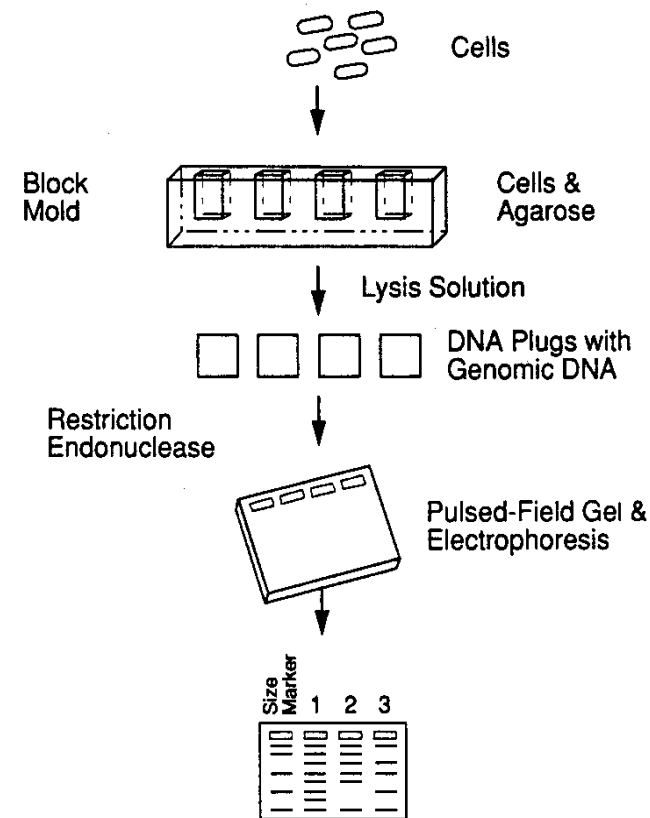
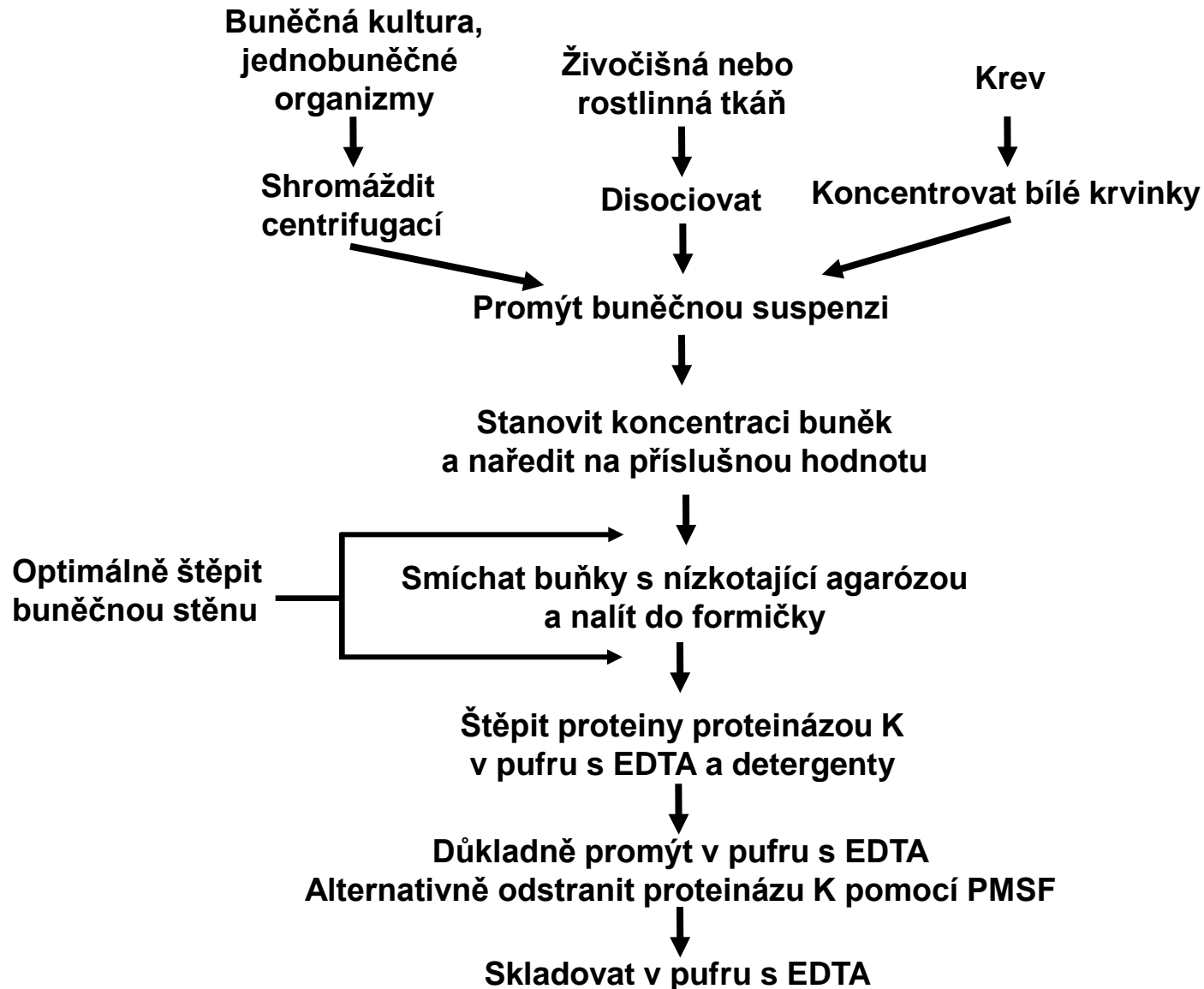
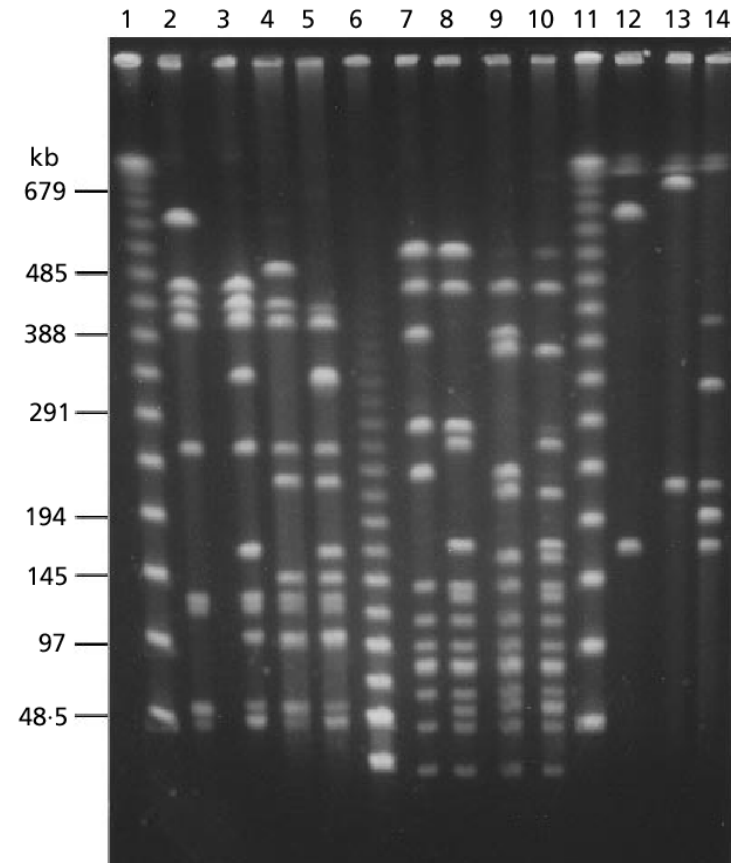
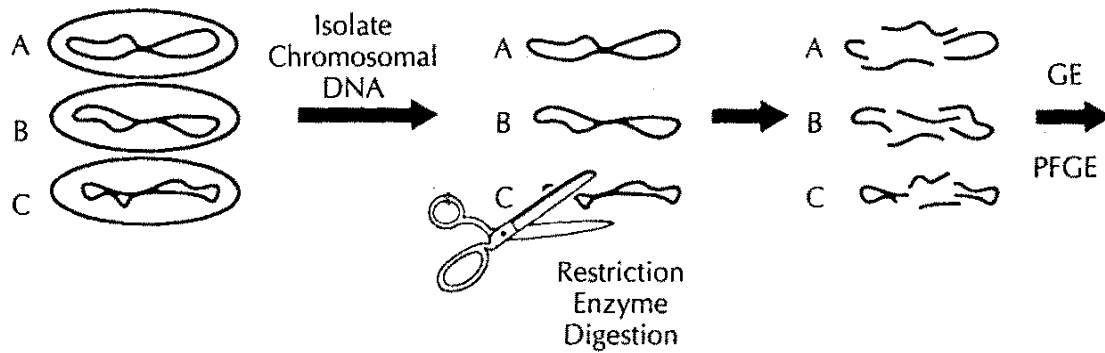


Schéma přípravy vzorků pro PFGE

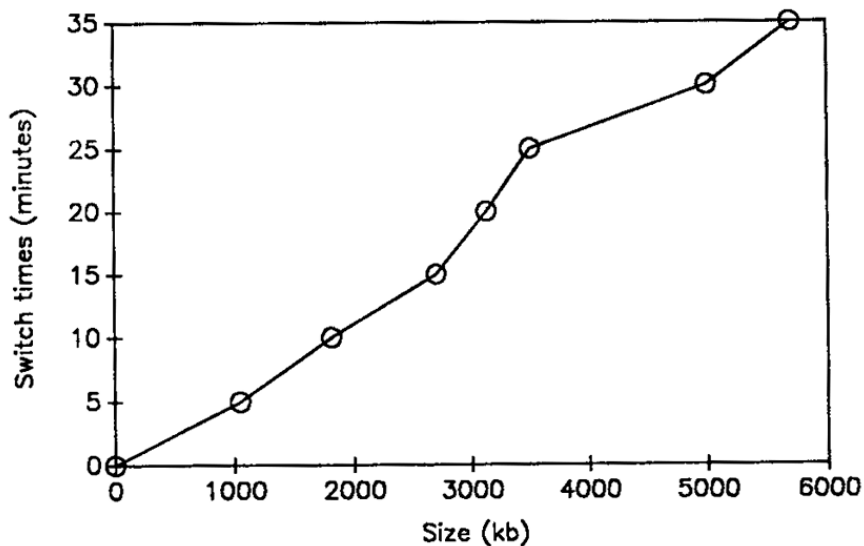
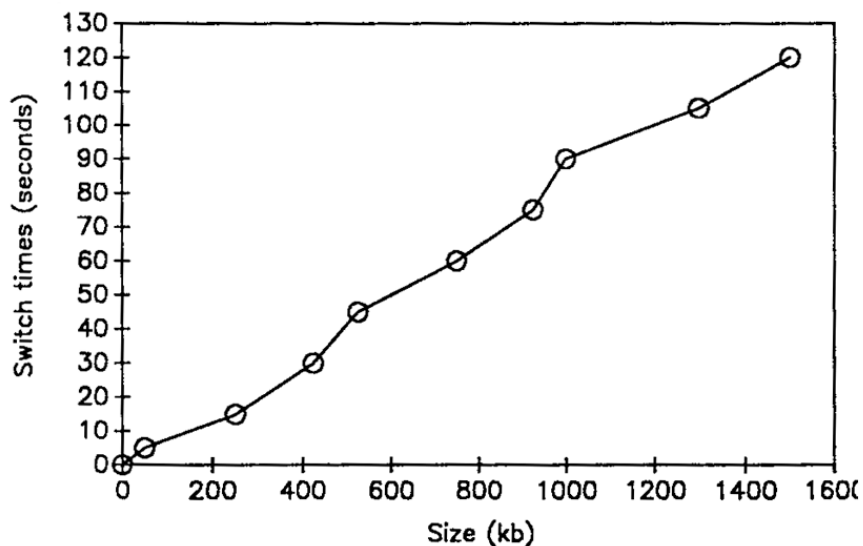


Využití PFGE pro diagnostické a typizační účely – makrorestrikční analýza



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)

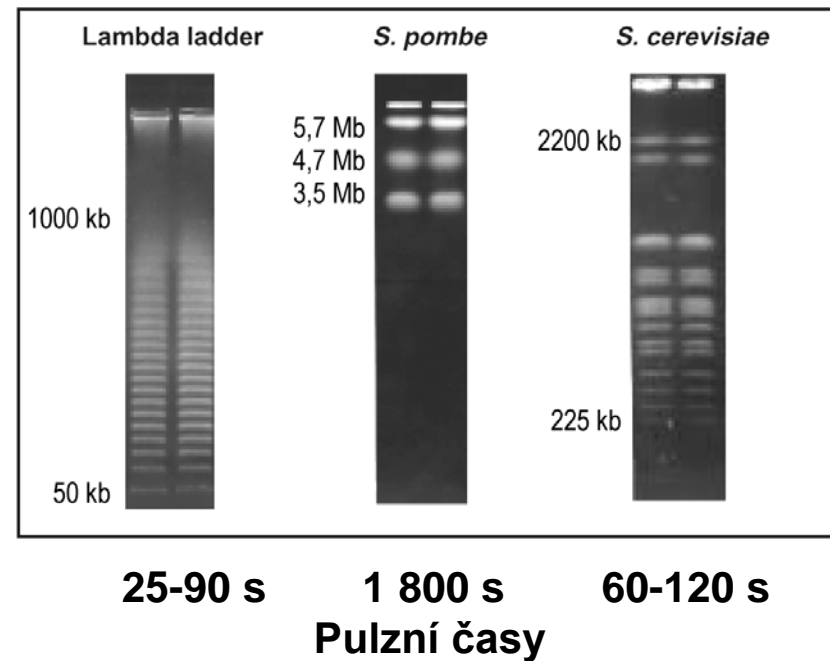
- *Schizosaccharomyces pombe*
(3,5-5,7 Mb)

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

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

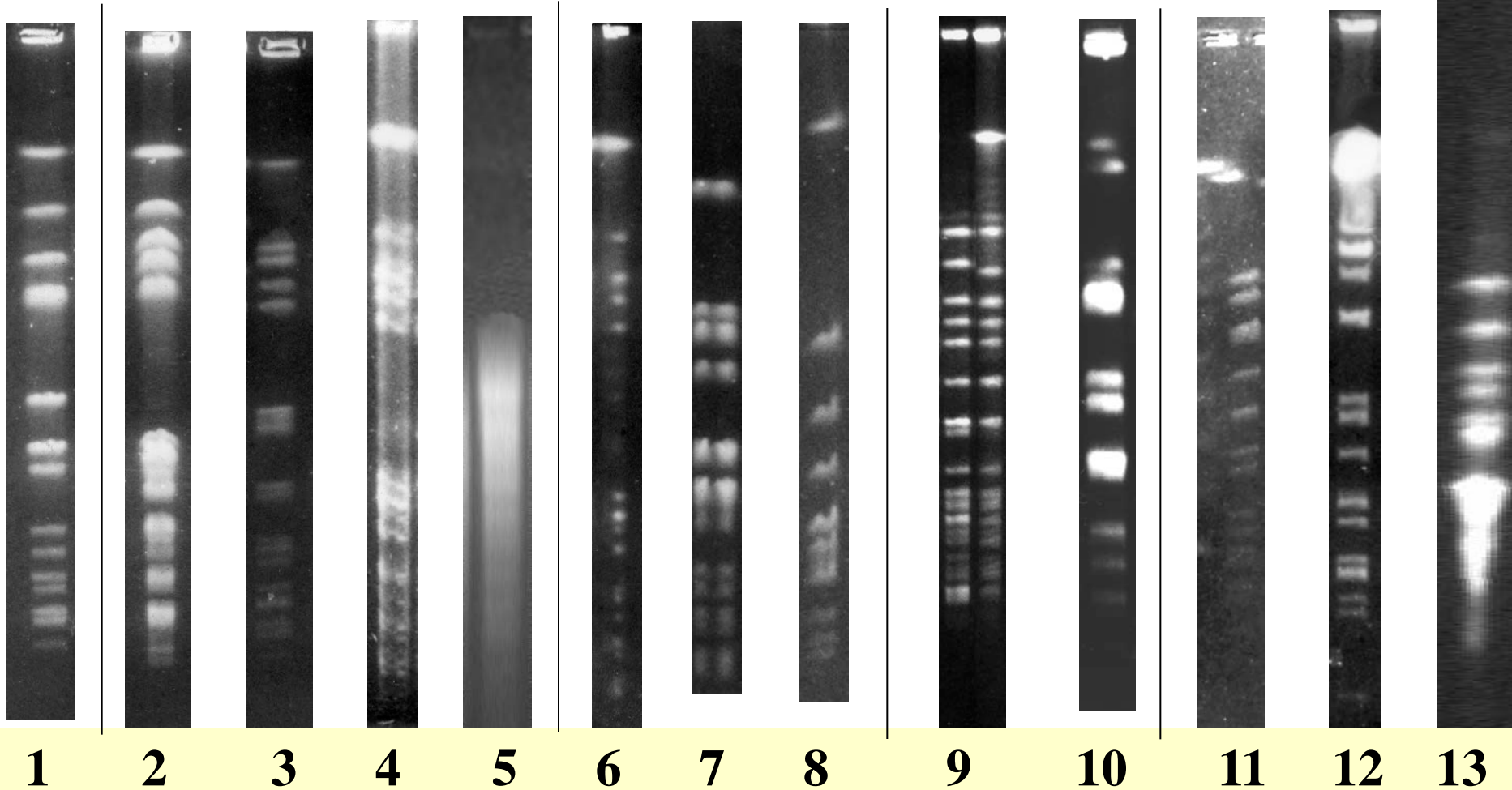
- Chromozomy *Dictyostelium discodium* (3,6-9,0 Mb)

- 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 pufu
11. Nedostatečné chlazení nebo není vodorovná podložka
12. Příliš krátké pulzní intervaly
13. Příliš dlouhé pulzní intervaly

Kmeny Staphylococcus aureus

Kmeny S. aureus

- 8325, 8325-4=ISP, 8325-4 (77+), 8325-4 (53+)
- ISP-8(53+), ISP-8 (77+), ISP-8 (91+), ISP-8 (47+)

Kmeny *Staphylococcus aureus*

- ISP8 – bezprofágový kmen odvozený z PS47
- ISP8 (47+) – profág začleňující se do prvního fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (53+) – profág začleňující se do druhého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (77+) – profág se *Sma*I místem v genomu začleňující se do pátého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (11+) – profág začleňující se do šestého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- PS47- tři profágy v genomu ϕ 11, ϕ 12 a ϕ 13
- PS47 (77+) – čtyři profágy
- PS47 (53+) – čtyři profágy

