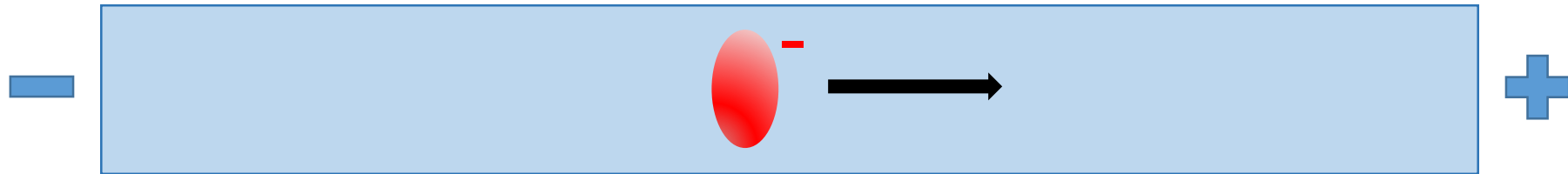


# Elektroforetické metody

# Elektroforéza

## Migrace nabitých částic v elektrickém poli



$$\begin{array}{l} \text{Rychlost migrace částice} \\ [\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}] \end{array} = \begin{array}{l} \text{elektroforetická mobilita částice} \\ [\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}] \end{array} \times \begin{array}{l} \text{síla elektrického pole} \\ [\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}] \end{array}$$

- velikost
- tvar
- náboj
- pH média
- teplota
- viskozita
- ...

# Elektroforéza – dělení + terminologie



## Metoda

- Zónová elektroforéza (na nosiči – gel)
- Volná elektroforéza (v roztoku)

## Separační médium - nosič

- Akrylamid
- Agaróza
- Speciální polymery
- ...

## Uspořádání

- Verikální
- Horizontální
- Kapilární

## Podmínky elektroforézy

- Denaturační (vyšší struktura biomolekul zničena)
- Nativní (zachována vyšší struktura biomolekul)



# Historie

Arne Wilhelm Kaurin Tiselius

Laureate

The Nobel Prize in Chemistry 1948

Prize Motivation: "for his research on electrophoresis and adsorption analysis, especially for his discoveries concerning the complex nature of the serum proteins"

Born: 10 August 1902, Stockholm, Sweden

Died: 29 October 1971, Uppsala, Sweden

Field: Physical chemistry Analytical biochemistry

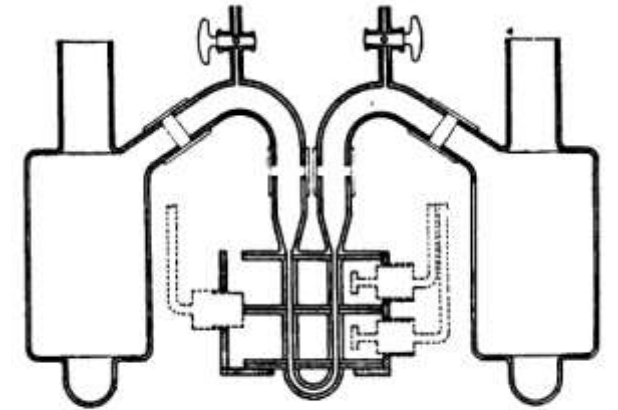


Fig. 1. Apparatus for electrophoretic analysis.

CLXXXII. ELECTROPHORESIS OF  
SERUM GLOBULIN  
II. ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF  
NORMAL AND IMMUNE SERA

By ARNE TISELIUS

*From the Institute of Physical Chemistry, University of Upsala*

*(Received 1 July 1937)*

# Elektroforéza

V molekulární biologii se standardně používá gelová elektroforéza

## Výhody gelové elektroforézy

- Jednoduchost, rychlost, cena
- Snadná izolace separovaných molekul
- Snadná změna podmínek – jiné chování biomolekul
- Široká škála množství materiálu – preparativní x analytická

## Požadavky na separační medium (gel)

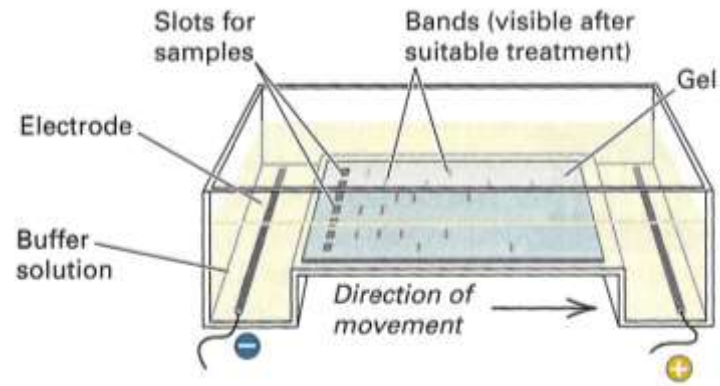
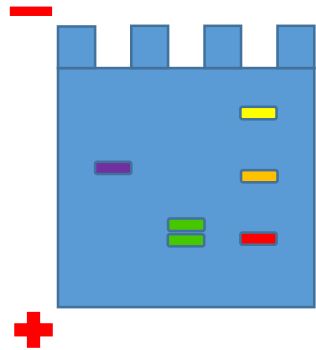
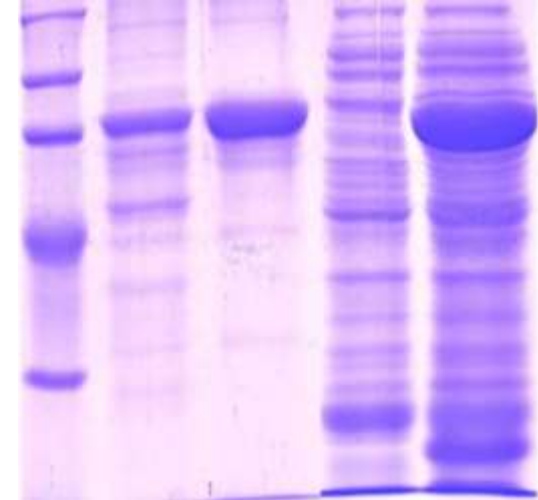
- Homogenita
- Inertnost
- Reprodukovatelnost
- Snadná příprava
- Transparentnost - vizualizace

## Používané gely

- Akrylamidový
- Agarozový
- Speciální polymery

# Elektroforéza

SDS-PAGE proteinů



DNA sekvenační gel



# K čemu elektroforéza nukleových kyselin?

## Separace molekul

- Velikost
- Náboj
- Sekundární (vyšší) struktura

## Proč separovat **nukleové kyseliny**?

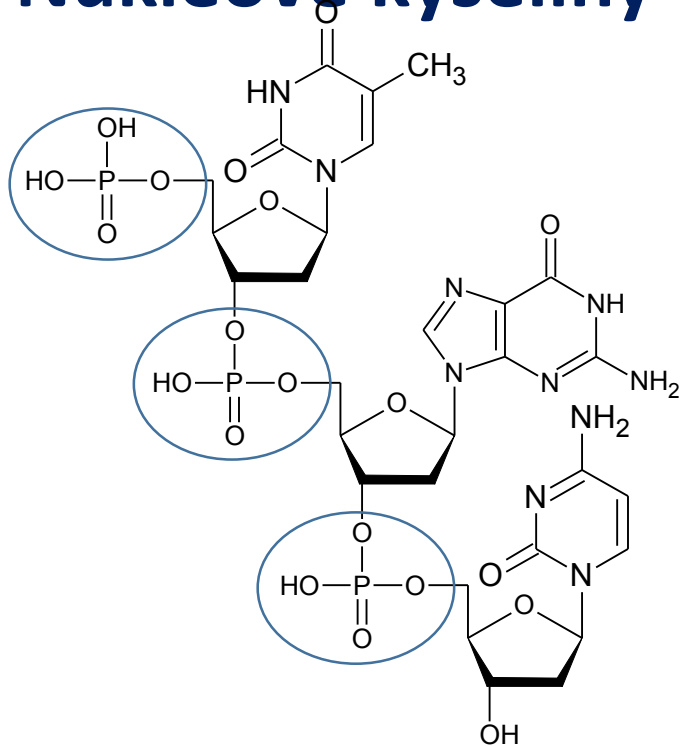
- Ověření výsledků enzymatických reakcí (polymerace, štěpení, ligace, ...) – nativní x denaturační gel
- Ověření konformace nukleových kyselin – nativní gel
- Kvalita syntetických oligonukleotidů – denaturační gel
- Purifikace nukleových kyselin – denaturační gel

## Proč separovat **proteiny**?

- Identifikace přítomnosti proteinů (při izolaci rekombinantních proteinů) – SDS-PAGE
- Proteomika – 2D-DIGE
- Ověření kvality nativních proteinů – nativní PAGE

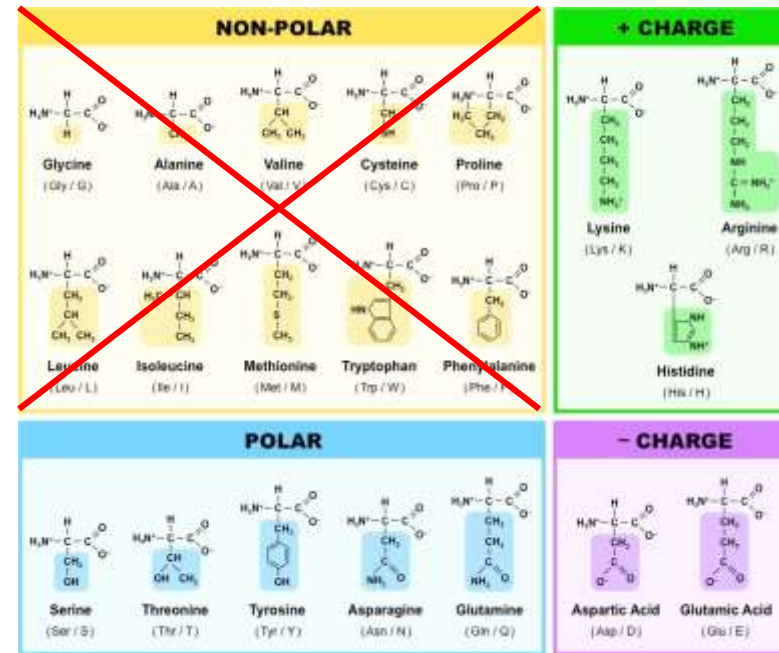
# Náboj makromolekul

## Nukleové kyseliny



- Náboj z cukr-fosfátové páteře
- Celkový náboj úměrný velikosti/délce molekuly

## Proteiny



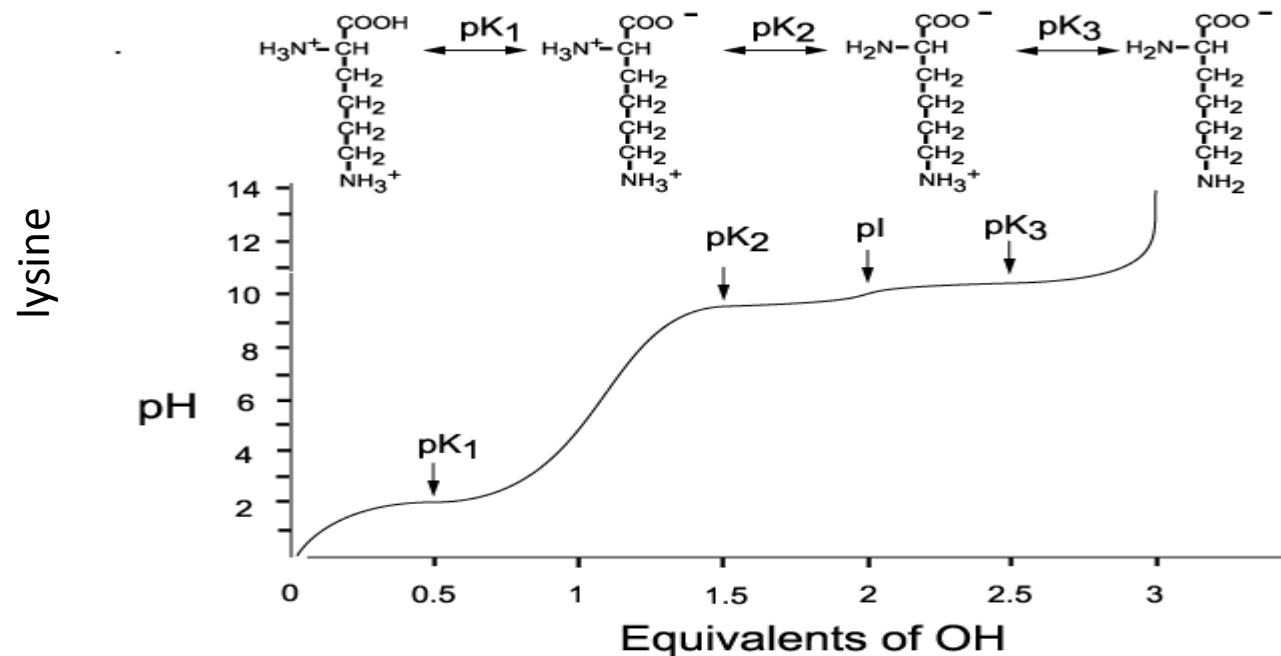
- Náboj z nabitých a polárních aminokyselin
- Celkový náboj silně závisí na primární sekvenci aminokyselin – tzv. **izoelektrický bod** (pI) proteinu



# Náboj proteinu – Izoelektrický bod

Celkový náboj proteinu je sumou nábojů jednotlivých aminokyselin v sekvenci proteinu, ale

Náboj aminokyselin je determinován pH roztoku



**Izoelektrický bod (pI) = pH při kterém má aminokyselina (protein) nulový náboj**

Pozitivní a negativní náboje se vzájemně kompenzují

- Při pH vyšším než pI – protein má celkový náboj záporný – migrace k anodě
- Při pH nižším než pI - protein má celkový náboj kladný – migrace ke katodě

# Elektroforéza dle podmínek

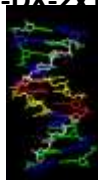
Denaturační

## Nukleové kyseliny

S1-G4-22b



S2-DX-2x12b



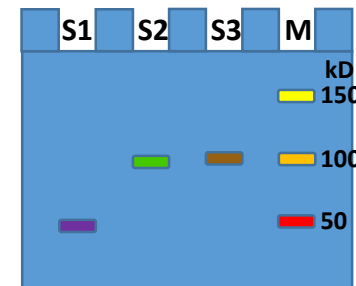
- Sekundární struktura zničena
- Migrace dle velikosti/délky
- 7M močovina + formamid + 50°C
- 100s – 1000s V

## Proteiny

S1-4x500AA-pl 5



S2-1x825AA-pl 5  
S3-1x825AA-pl 10



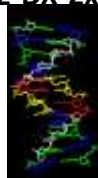
- Vyšší struktury zničeny
- Migrace dle velikosti/délky
- SDS-PAGE - dodecyl sulfát sodný
- 100s V

Nativní

S1-G4-22b



S2-DX-2x12b



- Sekundární struktura zachována
- Migrace dle velikosti, tvaru, molekularity
- Nativní podmínky
- 10s – 100s V

S1-4x500AA-pl 5



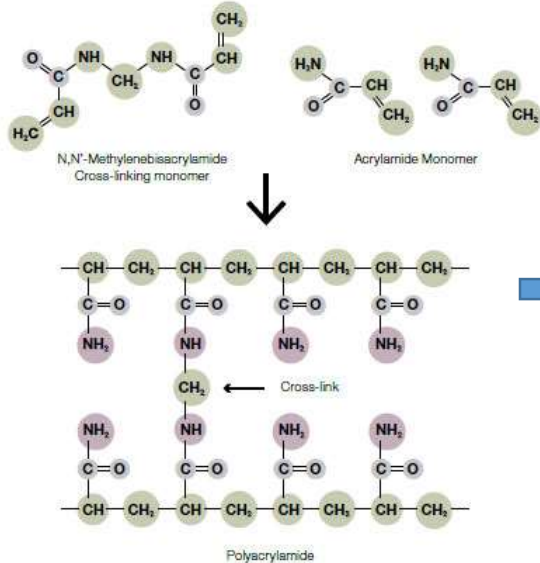
S2-1x825AA-pl 5  
S3-1x825AA-pl 10



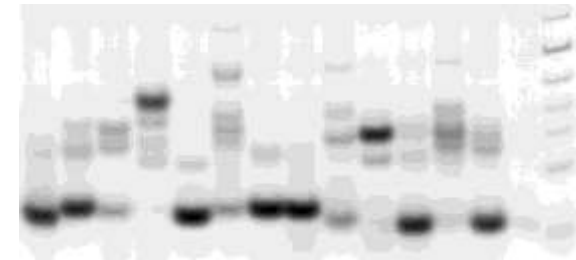
- Vyšší struktury zachovány
- Migrace dle velikosti (multimery) a pl proteinu
- Nativní podmínky
- 100s V

# Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

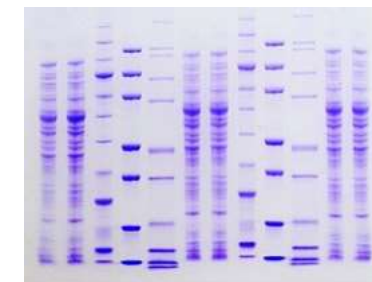
- Gel je směsí monomerů akrylamidu (polymerizuje do dlouhých lineárních řetězců) a N,N'-metylen bisakrylamidu (propojuje lineární řetězce akrylamidu) – **monomery jsou neurotoxiny**
- Standardní poměr mono : bis = 29 : 1 or 19 : 1      **nižší poměr = hustší gel (menší póry)**
- Standardní celkový obsah mono+bis 4 až 20 % w/v      **vyšší koncentrace = hustší gel (menší póry)**
- Polymerace iniciována přidávkem amonium persulfátu (APS) a tetrametylen diaminu (TEMED) ve finální koncentraci 0,1 % - radikálová polymerace
- Standardně vertikální uspořádání
- Vizualizace variabilní dle typu biomolekul



Nukleové kyseliny



Proteiny



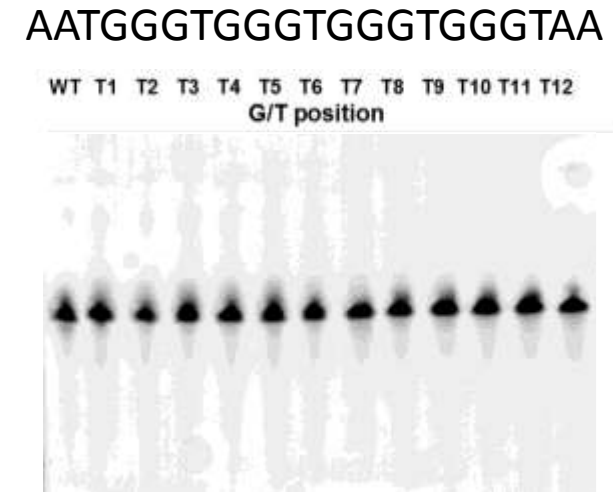
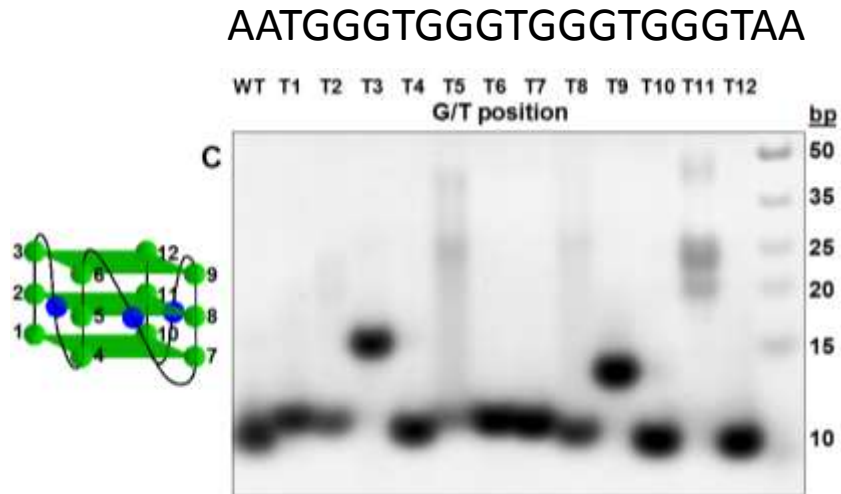
# Denaturační x nativní PAGE nukleových kyselin

Nativní PAGE DNA tvořící kvadruplex

- 16% PAG, 10mM K-fosfát pufr, pH7 + 85 mM KCl
- 40V, 15 h, 20°C
- StainAll

Denaturační PAGE DNA tvořící kvadruplex

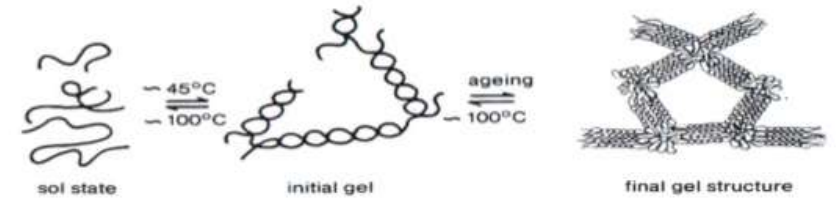
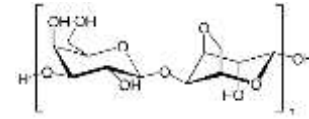
- 20% PAG, 1xTBE, 7M urea
- 500V, 1 h, 50°C
- StainAll



- Sekvence mají stejnou délku – 21 nt a velice podobnou velikost (1x G/T)
- Odlišná migrace na **nativním gelu** dána odlišnou konformací (T3) nebo molekuláritou (T11)
- Na **denaturačním gelu** migrace identická

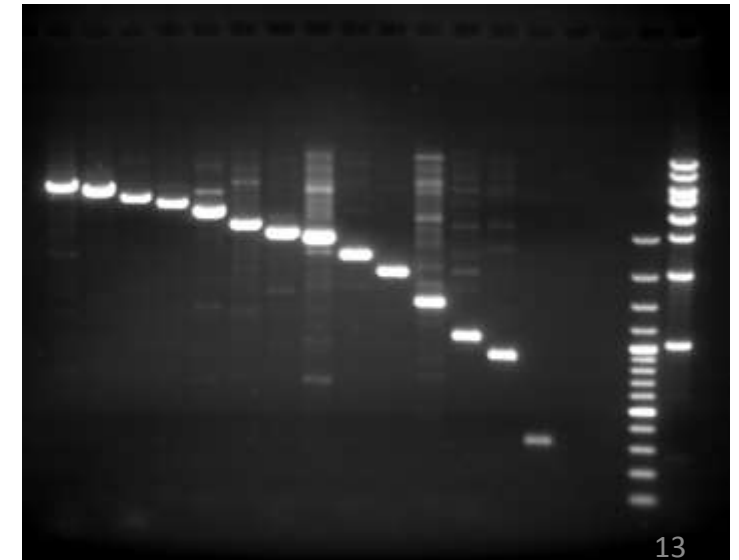
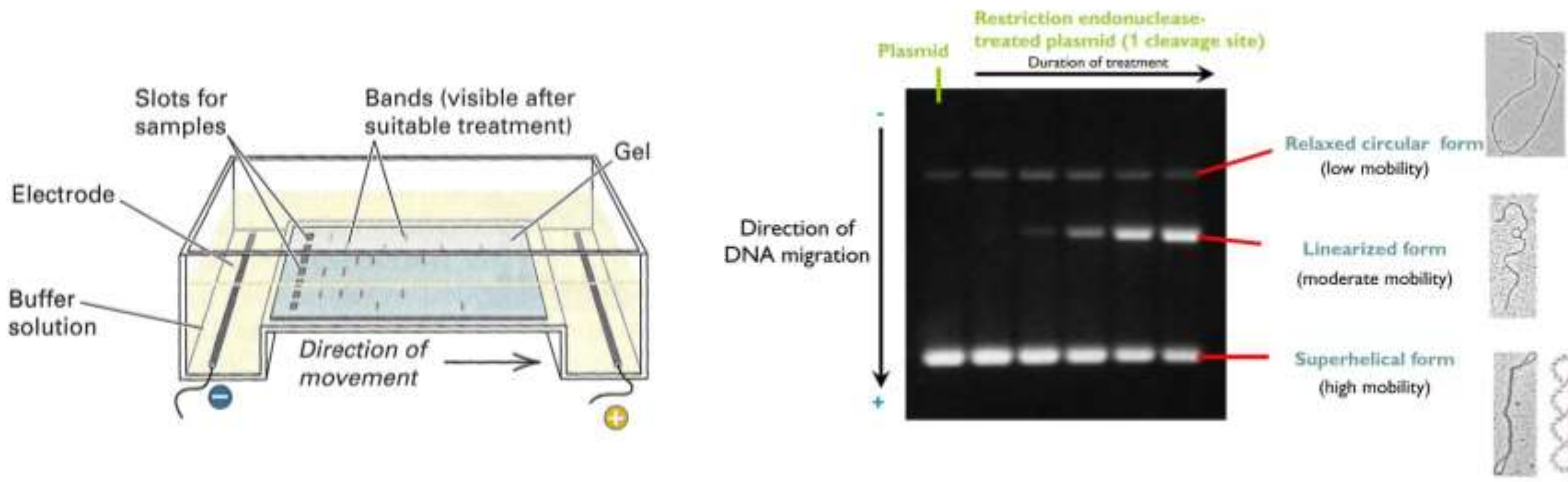
# Agarozová elektroforéza nukleových kyselin

- Matrix gelu tvořen agarozou – kopolymer manózy a galaktózy izolovaný z mořských řas
- Standardně se používá 0,3 – 4 % w/v + nativní podmínky
- Čím vyšší koncentrace tím vhodnější pro menší fragmenty
- Varem v roztoku pufru dojde k tání agarozy – následně nalití do formy a během chladnutí agarozy polymeruje
- Elektroforéza standardně v horizontálním uspořádání
- Obvykle barva pro vizualizaci přímo v gelu (EtBr, SYBR, ...) – přidává se během tuhnutí agarozy



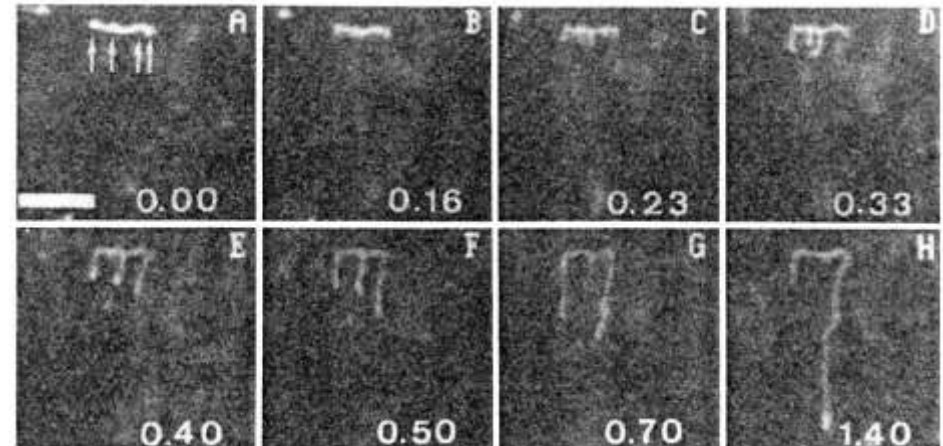
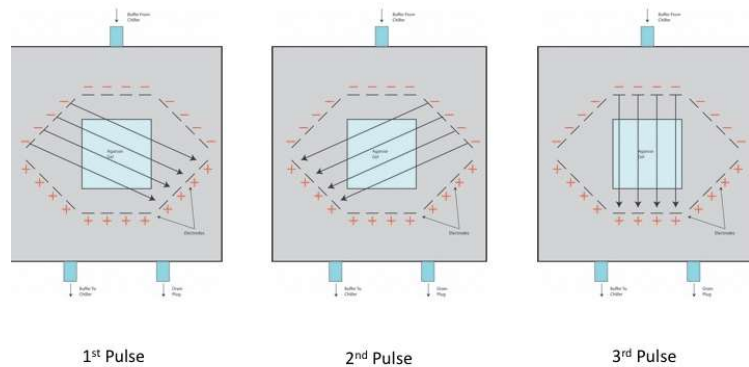
Nativní agarozová elektroforéza PCR amplifikovaných fragmentů promotoru genu *oct4*

- 1,5% agaróza, 1xTAE pufr, pH 7
- 80V, 45 min, 25°C
- Ethidium bromid v gelu + UV transiluminace



# Pulzní gelová elektroforéza

- Elektroforetická metoda pro separaci velkých molekul DNA (>30 kbp) – agarozový gel
- Molekuly  $NK > 20-30$  kbp migrují v (agarozovém) gelu při elektroforéze v konstantním elektrickém poli stejně, nezávisle na svoji velikosti – nerozlišitelné
- Pokud měníme v průběhu elektroforézy orientaci elektrického pole (tzv. pulzní pole), větší molekuly se re-orientují obtížněji – výsledný přímý pohyb je pomalejší - dochází k separaci i velkých molekul NK (horní limit až 10 Mbp – celé kvasinkové chromozomy, ...)



- Standardní uspořádání směrů elektrického pole – možná jsou i jiná uspořádání

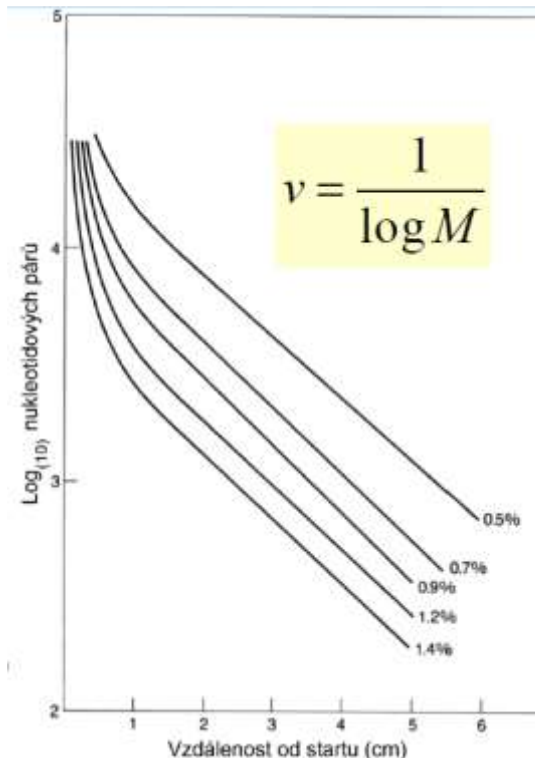
# Separace nukleových kyselin

- Pro **menší** molekuly se využívá **akrylamidový** gel
- Pro **větší** molekuly se využívá **agarozový** gel

Table 8.2: Approximate gel concentrations for separation of DNA linear fragments of various sizes

Gel Concentration	Separation Range (bp)
agarose - 0.3%	60,000 - 5,000
agarose - 0.7%	20,000 - 800
agarose - 0.9%	7,000 - 500
agarose - 1.2%	6,000 - 400
agarose - 1.5%	4,000 - 200
agarose - 2.0%	3,000 - 100
agarose - 4.0%	500 - 10
acrylamide - 4%	1,000 - 800
acrylamide - 10%	500 - 25
acrylamide - 20%	50 - 1

Separace molekul DNA dle velikosti v agarozovém gelu



# Vizualizace – nukleové kyseliny

	Metoda	Detekce	Citlivost	Konformační selektivita	Signál vztažen na	Typ gelu
	<b>Přímé značení NK</b>	Fluorescence, radiodetekce	Velmi vysoká (pmol-fl., fmol-radio.)	Ne	Značku = řetězce NK	PAG + agar.
	<b>UV shadowing (žádná značka)</b>	epi UV (254) + TLC deska	Nízká (0.3 µg)	Ne	Báze NK	PAG
	<b>Blot + hybridizace</b>	Fluorescence, radiodetekce	Velmi vysoká	Ne	Značku = řetězce NK	
Barvení po elektroforéze	<b>Ethidium bromid</b>	Fluorescence - trans UV (254)	vysoká (0.1 ng dsDNA) až nízká (konformace)	Vysoká	Báze NK	Agar. (PAG)
	<b>SYBR Gold/Green,...</b>	Fluorescence - VIS	Vysoká (0.02 ng dsDNA) až nízká (konformace)	Vysoká	Báze NK	Agar. (PAG)
	<b>StainsAll (Sigma)</b>	Foto - VIS	Střední až nízká (100-1 ng)	Nízká	Báze NK	PAG
	<b>Stříbro</b>	Foto - VIS	Vysoká (pg)	Střední	Báze NK	PAG

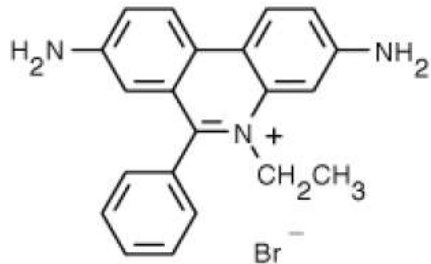
Barva v gelu  
EtBr a další barvy mohou být přidány přímo do gelu – mohou ovlivňovat migraci při detekci je vyšší pozadí, ale práce je jednodušší



# Vizualizace – nukleové kyseliny

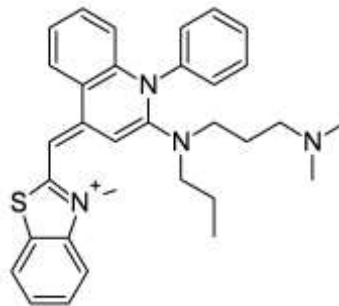
## Ethidium bromid

- Interkalační barvivo
- 20-30x nárůst fluorescence po interkalaci – UV 254, 312 nm
- 1 EtBr / 4-5 bp DNA
- RNA i DNA, preferenčně ds - 0,1ng (dsDNA) – 5 ng (RNA)
- Akrylamid zhasí EtBr fluorescenci
- **Silně mutagenní**



## SYBR Green I

- Interkalační barvivo
- 1000x nárůst fluorescence po interkalaci – UV 300, VIS 490 nm
- RNA i DNA, preferenčně ds - 0,05ng (dsDNA) – 1 ng (RNA)
- Konformační selektivita
- **Mnohem méně mutagenní**

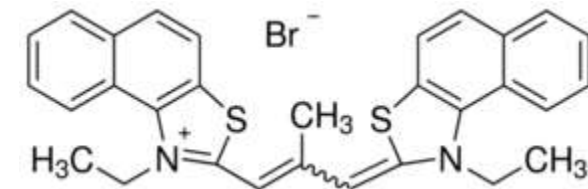


## Stříbro

- Přímá vizualizace - viditelné
- RNA, DNA i proteiny
- Citlivost obdobná EtBr
- Vhodné i pro akrylamidové gely
- Složitější barvení – fixace, ...

## Stains All

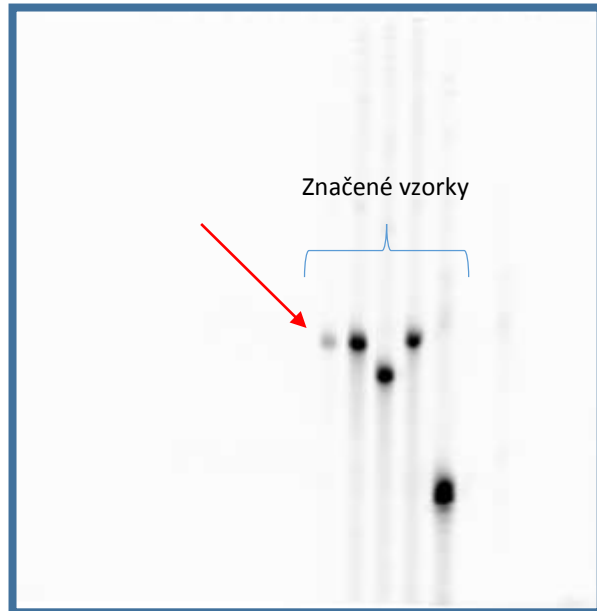
- Přímá vizualizace - viditelné
- RNA, DNA i proteiny
- Citlivost nižší než EtBr
- Vhodné pro akrylamidové gely



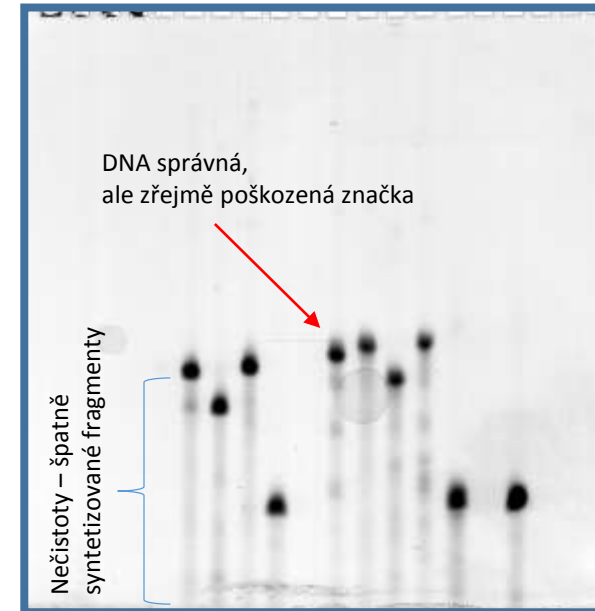
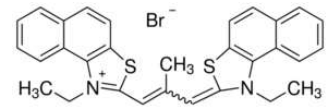
# Denaturační PAGE DNA - barvení

Přímá vizualizace vzorků  
Některé značené 5'-FAM  
Typhoon FLA9300 skener

- Laser 473 nm
- Emisní filtr LBP (long-pass blue)



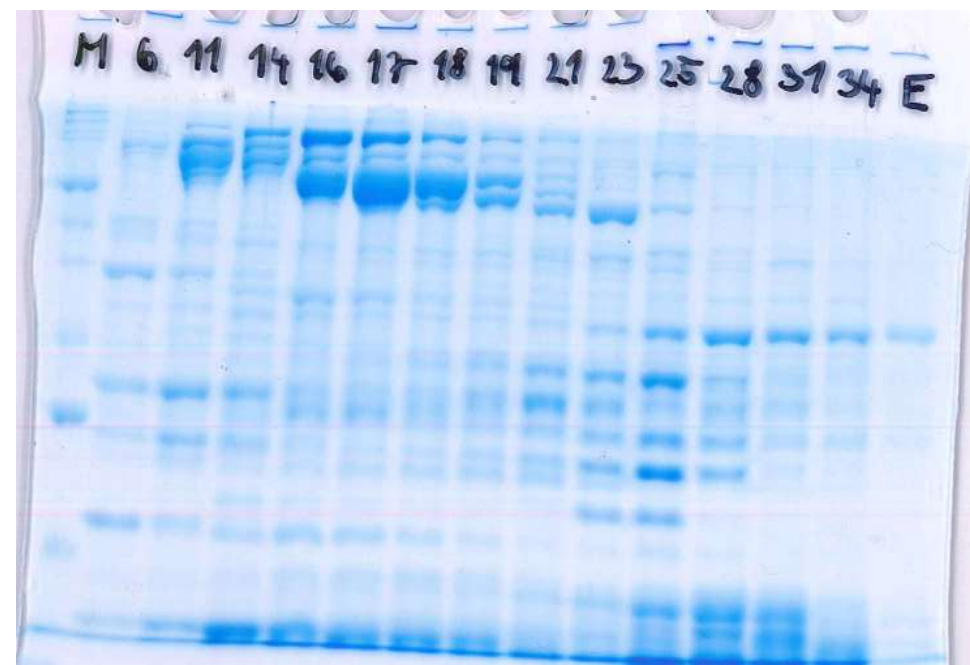
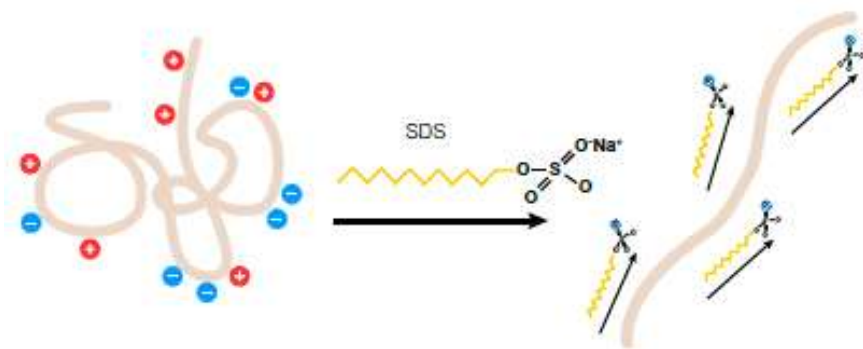
Post-elektroforetické barvení Stains-All  
Barví vše  
Klasický skener – viditelné světlo



# Denaturační PAGE proteinů – SDS

- Migrace proteinů za nativních podmínek je ovlivněna velikostí, konformací a především **nábojem (pI)** – na rozdíl od NK – obtížná interpretace elektroforetogramu za nativních podmínek
- Konstantního náboje a linearizace molekuly proteinu je docíleno obalením molekulami detergentu – **dodecylsulfátu sodného (SDS)** – protein je **denaturován**
- SDS se váže poměrně konstantně – náboj daný SDS zhruba odpovídá molekulové hmotnosti proteinu – separace pouze dle velikosti
- Disulfidové vazby v proteinech se eliminují **redukčním činidlem** ( $\beta$ -merkaptoetanol, dithiothreitol) a následným **varem**

SDS-PAGE frakcí lyzátu buněk E.coli – barvení Comassie



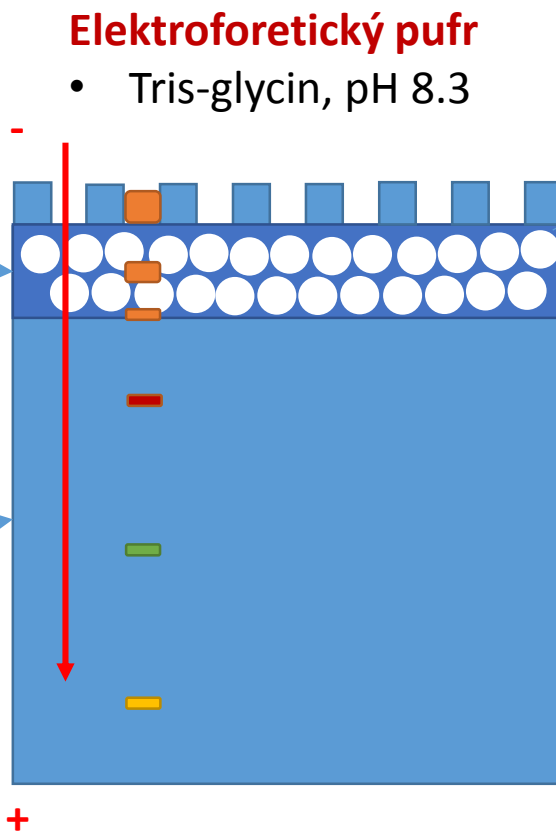
# Denaturační PAGE proteinů – SDS

## Stacking gel

- Zostření směsi proteinů do jednoho úzkého proužku – při následné separaci dle velikosti startují zároveň
- Silně porézní gel (málo akrylamidu)
- cca 5% akrylamid + SDS
- Tris.Cl pufr, pH 6.8

## Running gel

- Separace proteinů dle velikosti
- 4-20% akrylamid + SDS
- Tris.Cl pufr, pH 8.8



## Elektroforetický pufr

- Tris-glycin, pH 8.3

pH 8.3 – glycinát negativně nabitý – rychlý

Hranice - změna

pH 6.8 – glycinát = zwitter-ion – migrace nakonci

pH 6.8 – proteiny v SDS – migrace uprostřed

pH 6.8 – Cl<sup>-</sup> – migrace v čele

Hranice – změna – proteiny tlačeny vpřed glycinátovou zónou, která v pH 8.8 začíná migrovat rychle

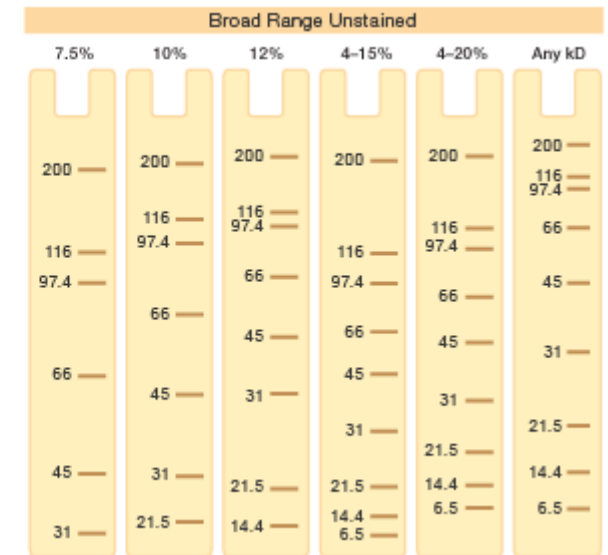
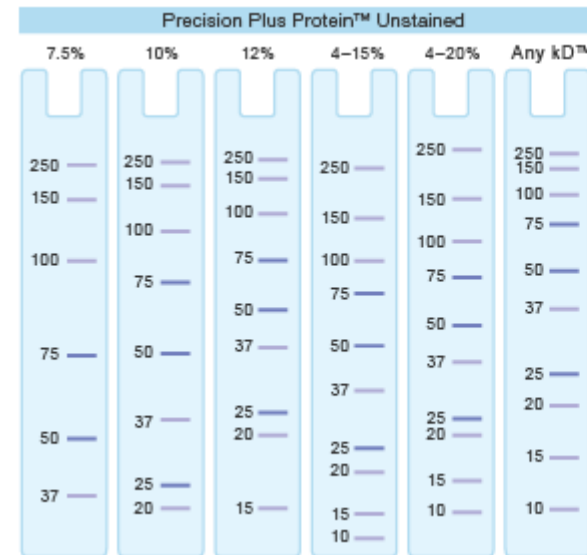
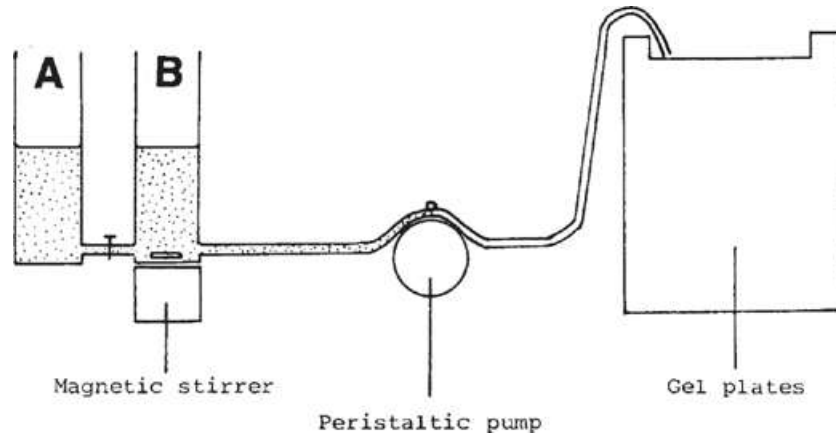
pH 8.8 – glycinát negativně nabitý – rychlý

## Izotachoforéza

- Iso-tacho = stejná rychlost
- Glycinate (na konci) – proteiny (uprostřed) – chloridy (v čele) migrují stejnou rychlostí
- Stabilní uspořádání v průběhu migrace stacking gelem – jednotlivé komponenty jsou omezeny v možnosti přecházet do jiných zón (pH x pI, síla el. pole, ...)

# Gradientové polyakrylamidové gely

- Zvyšující se koncentrace akrylamidu v gelu směrem ke spodní části gelu
- Větší rozsah molekulových hmotností separovaných gelem
- Lepší rozlišení proteinů o podobné molekulové hmotnosti



# Nativní x Denaturační

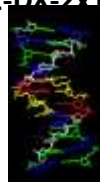
Denaturační

## Nukleové kyseliny

S1-G4-22b



S2-DX-2x12b



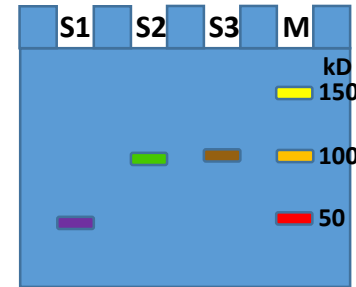
- Sekundární struktura zničena
- Migrace dle velikosti/délky
- 7M močovina + formamid + 50°C
- 100s – 1000s V

## Proteiny

S1-4x500AA-pl 5



S2-1x825AA-pl 5  
S3-1x825AA-pl 10



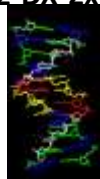
- Vyšší struktury zničeny
- Migrace dle velikosti/délky
- SDS-PAGE - dodecyl sulfát sodný
- 100s V

Nativní

S1-G4-22b



S2-DX-2x12b

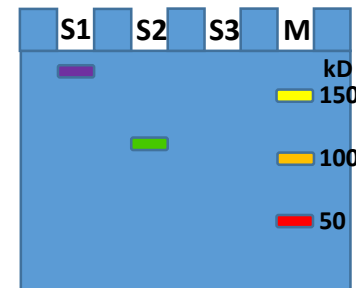


- Sekundární struktura zachována
- Migrace dle velikosti, tvaru, molekularity
- Nativní podmínky
- 10s – 100s V

S1-4x500AA-pl 5



S2-1x825AA-pl 5  
S3-1x825AA-pl 10



- Vyšší struktury zachovány
- Migrace dle velikosti (multimery) a pl proteinu
- Nativní podmínky
- 100s V

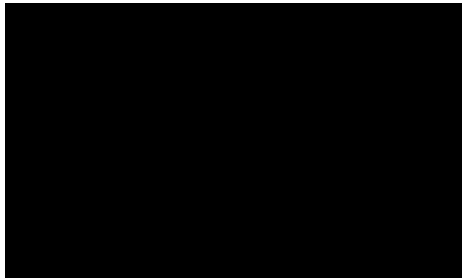
# Vizualizace proteinů – SDS-PAGE

## Nespecificky

- Barvení všech proteinů v gelu nespecifickým barvivem

### Comassie brilliant blue

- Přímá vizualizace - viditelné
- Proteiny –  $\text{SO}_3^{2-}$  reaguje s pozitivními AK, benzen s negativními AK
- Nutné odbarvení - destain



### Stříbro

- Přímá vizualizace - viditelné
- RNA, DNA i proteiny
- Citlivost obdobná EtBr
- Vhodné i pro akrylamidové gely
- Složitější barvení – fixace, ...

## Specificky

- Přenos proteinů z gelu na membránu (nitrocelulóza, ...) – western blot – někdy příště
  - Barvení membrány prostřednictvím protilátek

# Izoelektrická fokusace (IEF)

- Gel připraven s fixním gradientem pH (immobilized pH gradient – IPG) – směs amfolytů (slabé kyseliny či báze) kovalentně vázaných do struktury gelu – IPG stripy komerčně dostupné
- Akrylamidový gel s velkými póry – nemá separační účinek – separace pouze dle pI proteinu, ne velikosti
- Při migraci proteinu gelem s pH gradientem se mění náboj proteinu – v oblasti kde pI = pH protein ztratí náboj a přestane migrovat

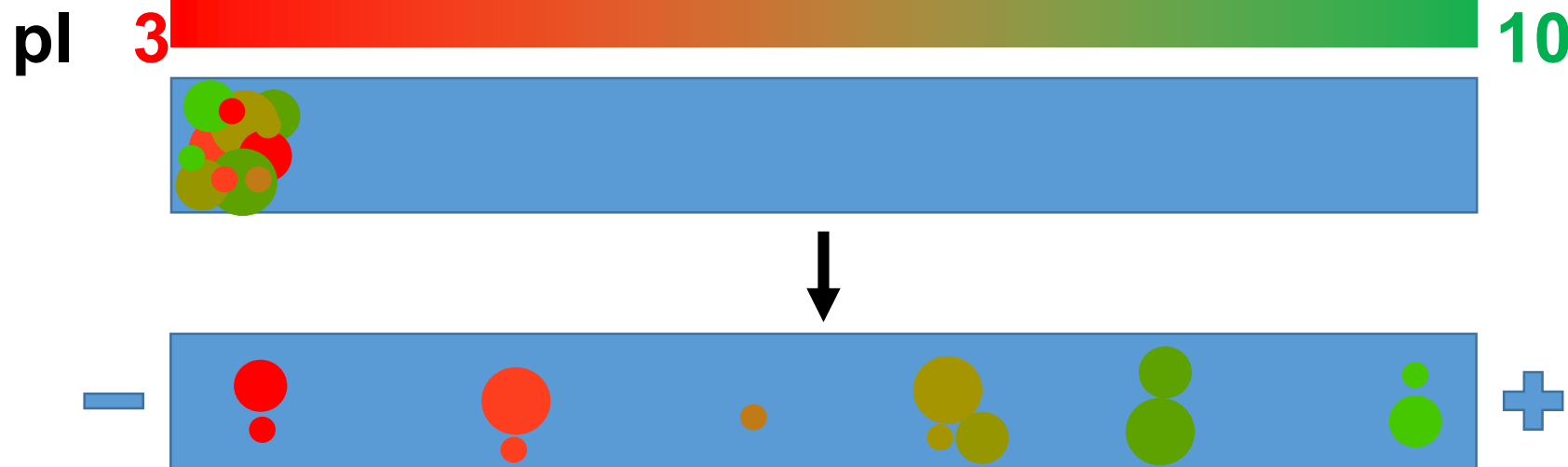
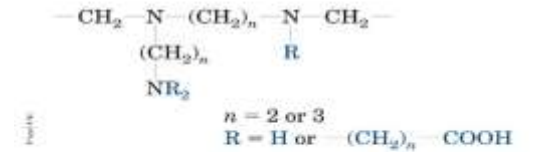


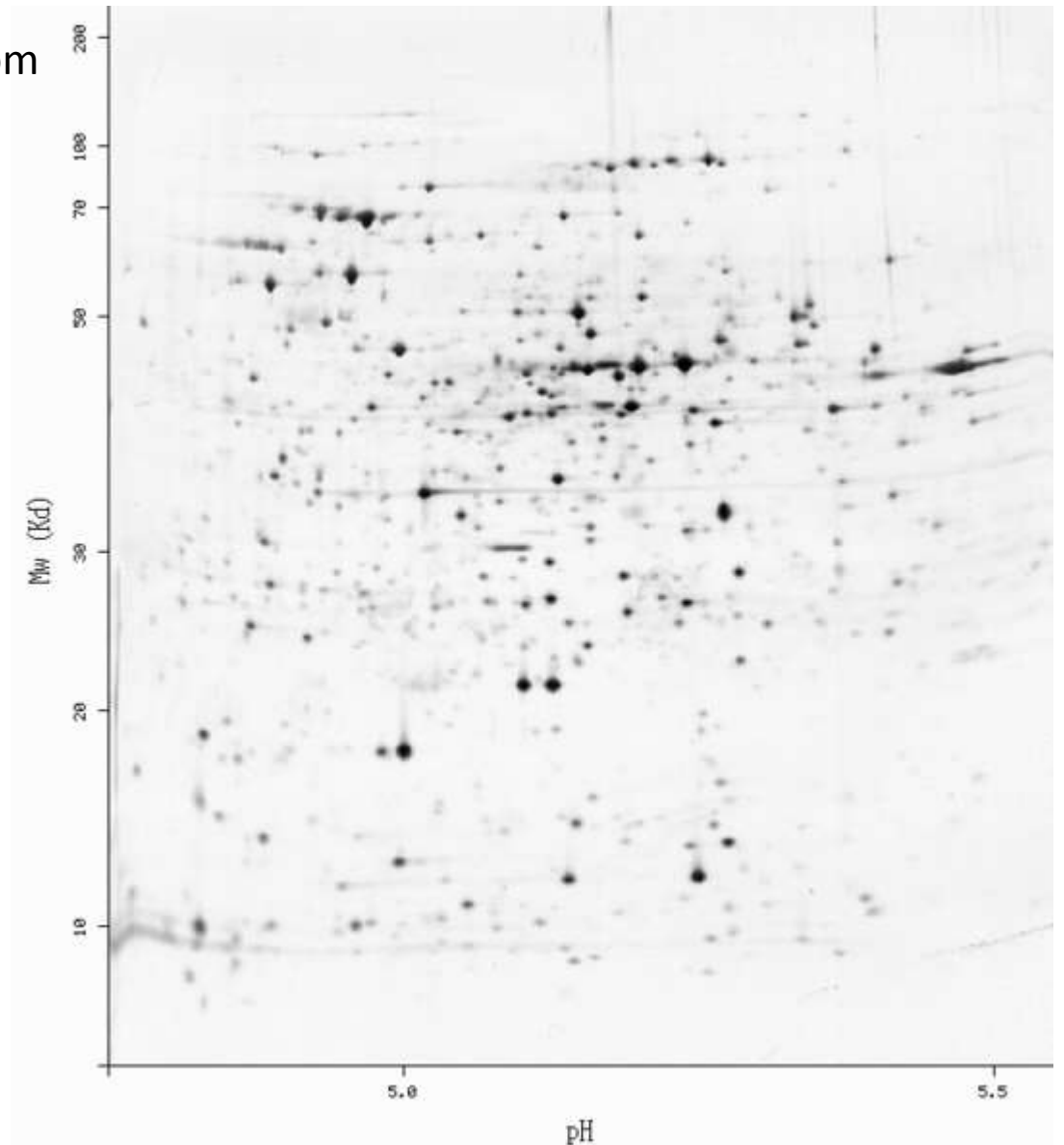
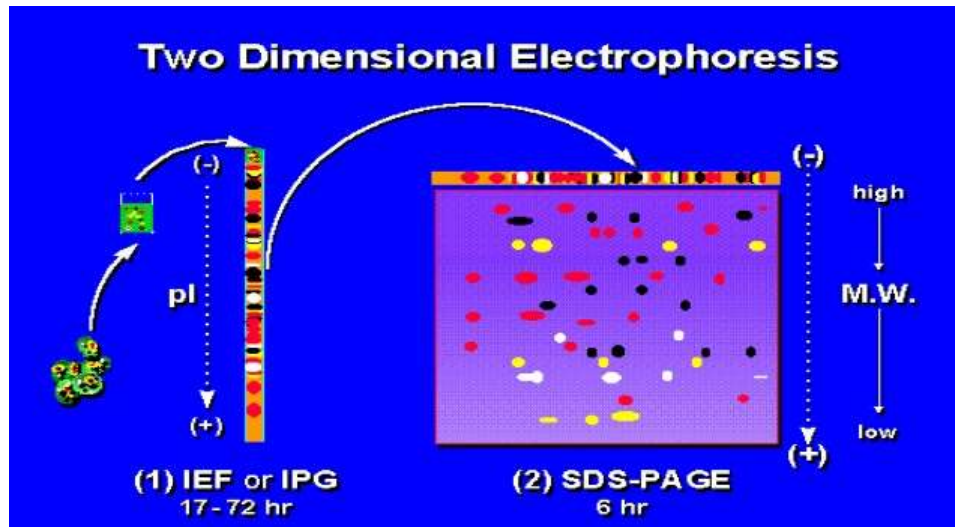
Figure 6-26 General formula of the ampholytes used in isoelectric focusing.





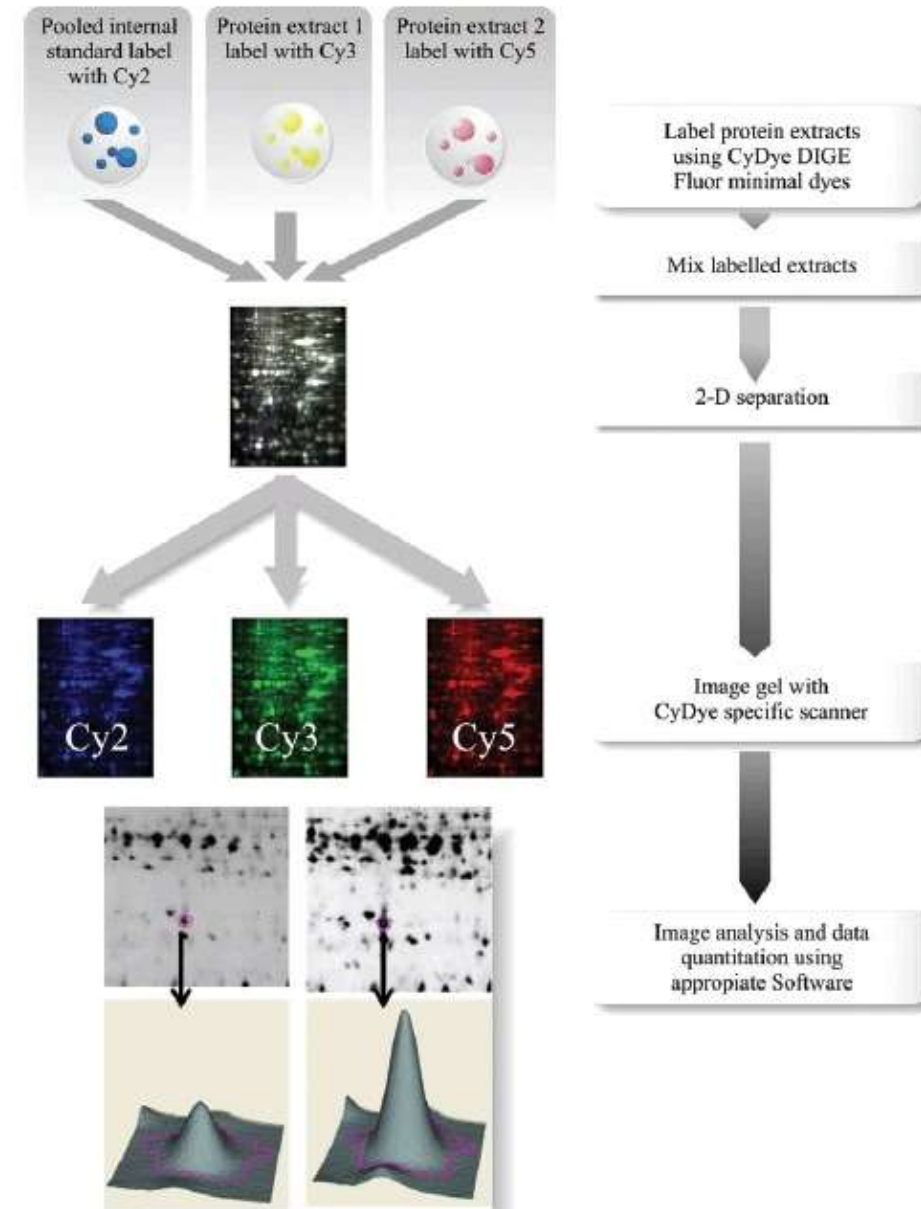
# Dvourozměrná (dvoudimenzionální) PAGE

- Souběžná analýza velkého množství proteinů (>1000) – proteom
- Nejprve izoelektrická fokusace v IPG stripu – separace dle pI
- Následně SDS-PAGE v kolmém směru – separace dle velikosti
- Následně barvení
- Každý protein má unikátní pozici
- Obtížná interpretace



# Diferenční 2D gelová elektroforéza (2D-DIGE)

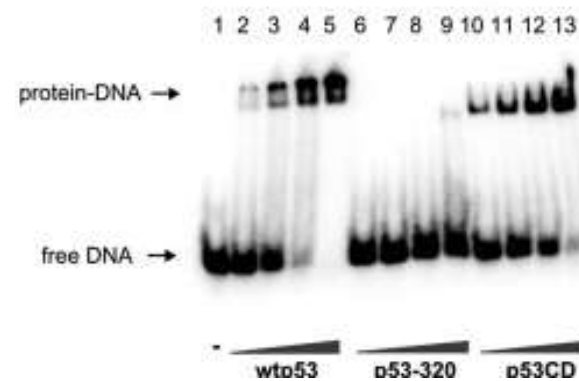
- Extrakty proteinů získané např. za různých podmínek kultivace označeny různými fluorescenčními značkami
- Třetí fluorescenční značkou označen kontrolní experiment
- Vše smícháno, následně 2D-PAGE
- Analýza výsledku v jednotlivých barevných kanálech pro použité fluorescenční barvy – 2D-DIGE
- Rozdíly indikují změny v expresi příslušných proteinů



{Diez R. et al. in Neuroproteomics, ed. Alzate O. 2010}

# Elektroforetická retardační analýza

- Electromobility shift assay (EMSA)
- Srovnání elektroforetické migrace např. molekuly DNA samotné a při interakci s vazebným proteinem – vázaný protein zvyšuje velikost komplexu - rozdíl v migraci – kvantifikovatelné
- Tzv. Supershift assay – k interagujícímu proteinu je přidána příslušná protilátka – podstatné zvýšení velikosti komplexu – výraznější zpomalení



{Petr M. et al., Biosci Rep, 2016}

# Kapilární gelová elektroforéza

- Gel (komerční syntetický polymer) umístěn v kapiláře; výrazně vyšší napětí (desítky kV)
- Nutné menší množství vzorku, lepší rozlišení
- Variabilní možnosti detekce – standardně fluorescence – možnost vícebarevného značení x interní velikostní standard
- Možnost automatizace a paralelizace – kapilární sekvenátory

