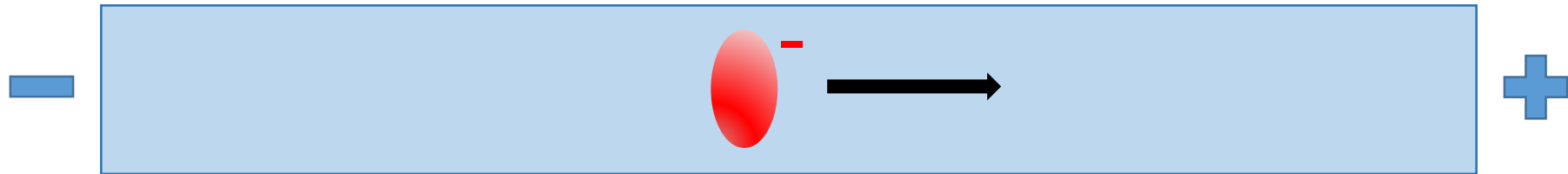


Elektroforetické metody

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

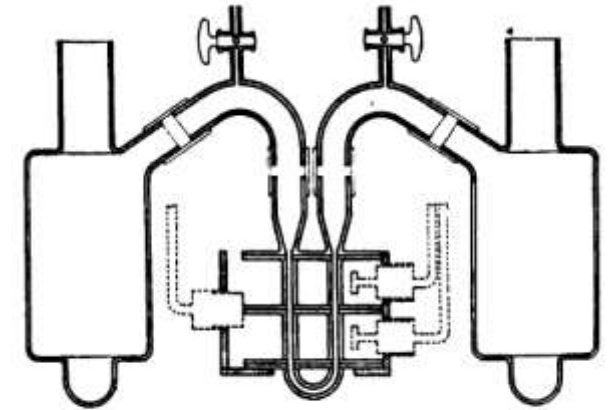


Fig. 1. Apparatus for electrophoretic analysis.

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)

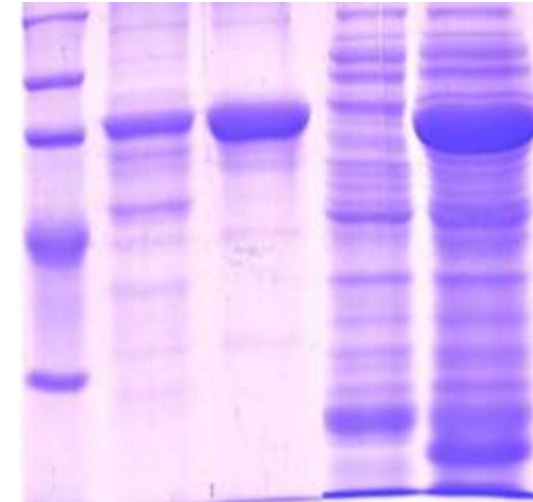
- Homogenita
- Inertnost
- Reprodukovatelnost
- Snadná příprava
- Transparentnost - vizualizace

Používané gely

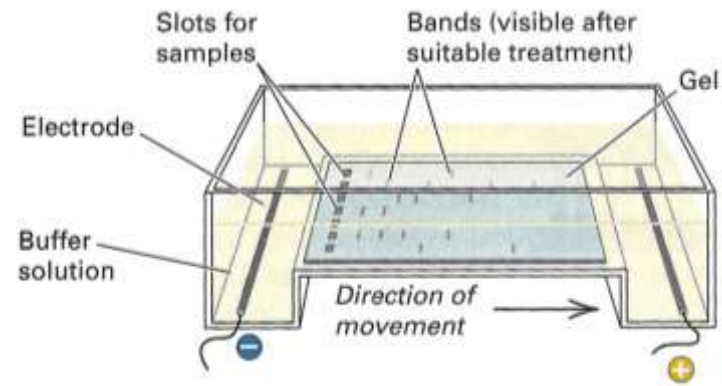
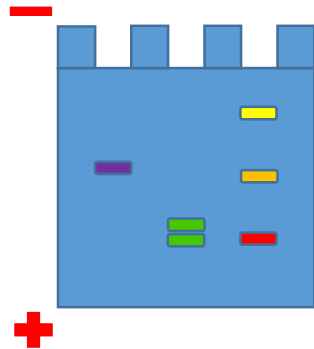
- Akrylamidový
- Agarozový
- Speciální polymery

Elektroforéza

SDS-PAGE proteinů



DNA sekvenační gel



K čemu elektroforéza nukleových kyselin?

Separace molekul

- Velikost
- Náboj
- Sekundární (vyšší) struktura

Proč separovat **nukleové kyseliny**?

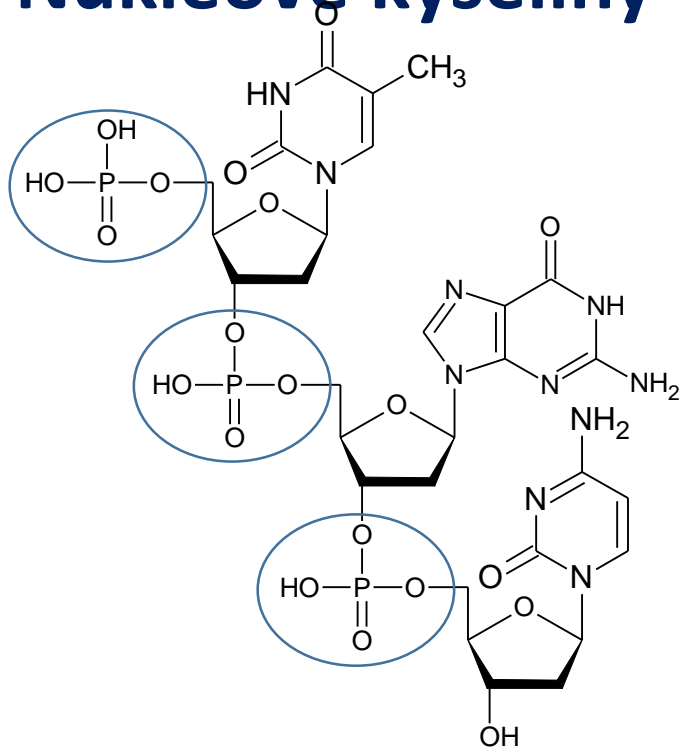
- Ověření výsledků enzymatických reakcí (polymerace, štěpení, ligace, ...) – nativní x denaturační gel
- Ověření konformace nukleových kyselin – nativní gel
- Kvalita syntetických oligonukleotidů – denaturační gel
- Purifikace nukleových kyselin – denaturační gel

Proč separovat **proteiny**?

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

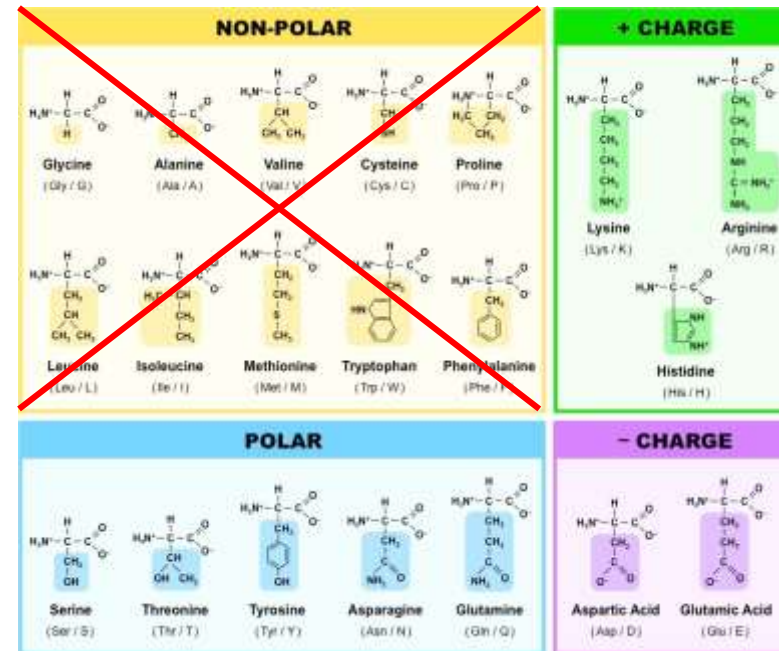
Náboj makromolekul

Nukleové kyseliny



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

Proteiny

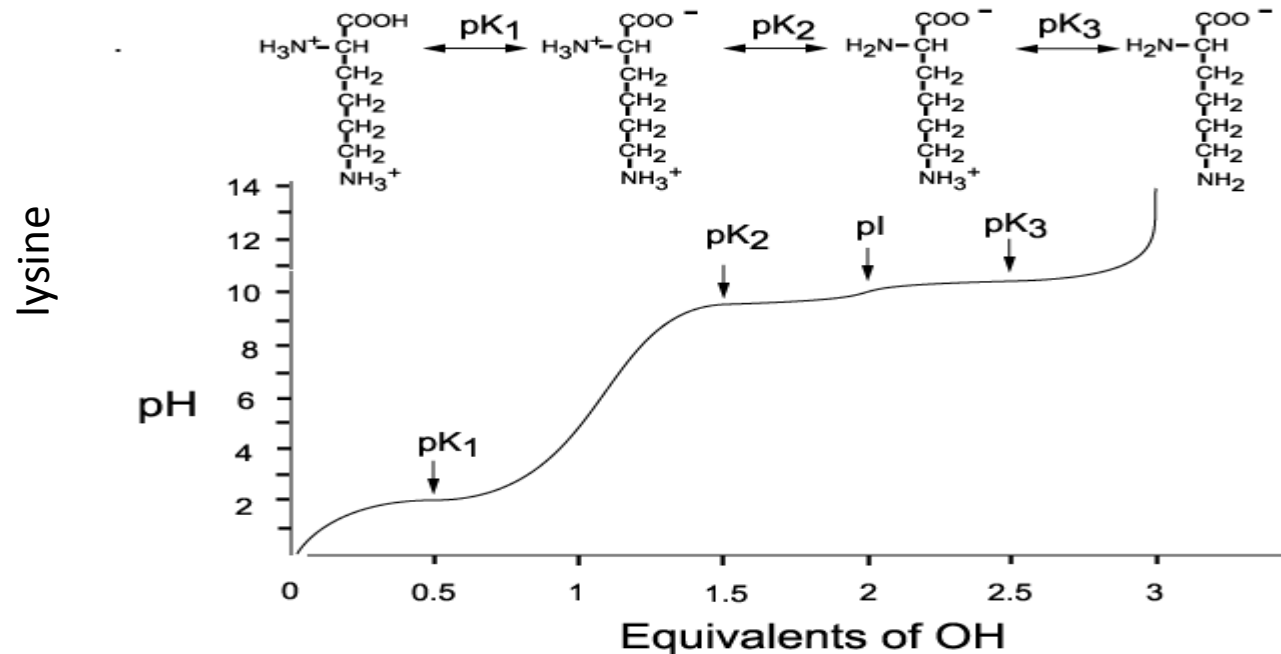


- Náboj z nabitých a polárních aminokyselin
- Celkový náboj silně závisí na primární sekvenci aminokyselin – tzv. **izoelektrický bod** (pI) proteinu

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



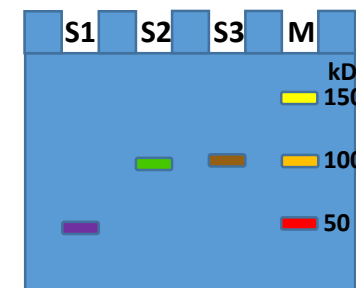
- Sekundární struktura zničena
- Migrace dle velikosti/délky
- 7M močovina + formamid + 50°C
- 100s – 1000s V

Proteiny

S1-4x500AA-pl 5



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



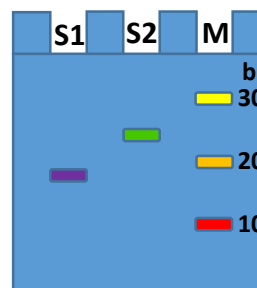
- Vyšší struktury zničeny
- Migrace dle velikosti/délky
- SDS-PAGE - dodecyl sulfát sodný
- 100s V

Nativní

S1-G4-22b



S2-DX-2x12b

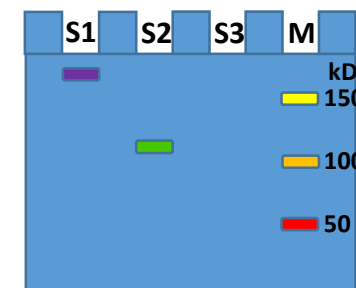


- Sekundární struktura zachována
- Migrace dle velikosti, tvaru, molekularity
- Nativní podmínky
- 10s – 100s V

S1-4x500AA-pl 5



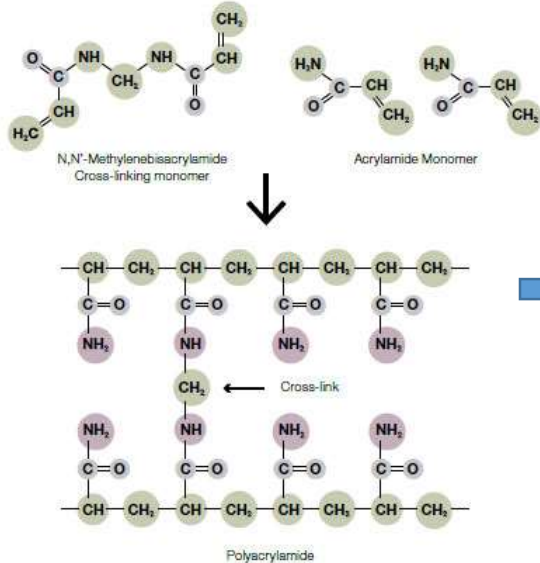
S2-1x825AA-pl 5
S3-1x825AA-pl 10



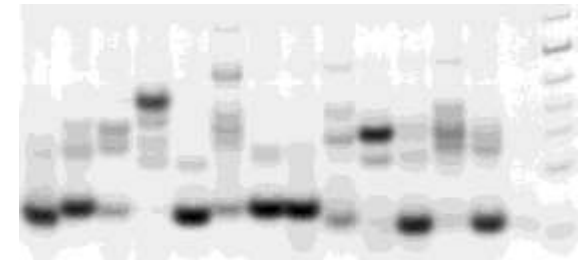
- Vyšší struktury zachovány
- Migrace dle velikosti (multimery) a pl proteinu
- Nativní podmínky
- 100s V

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

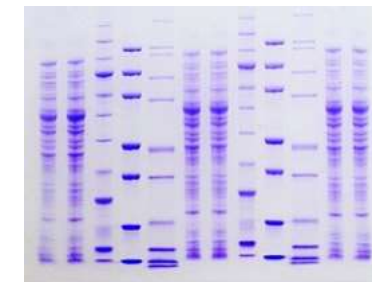
- Gel je směsí monomerů akrylamidu (polymerizuje do dlouhých lineárních řetězců) a N,N'-metylen bisakrylamidu (propojuje lineární řetězce akrylamidu) – **monomery jsou neurotoxiny**
- Standardní poměr mono : bis = 29 : 1 or 19 : 1 **nižší poměr = hustší gel (menší póry)**
- Standardní celkový obsah mono+bis 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



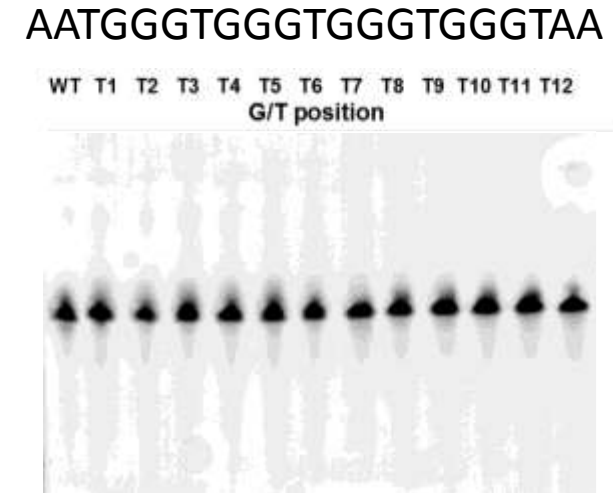
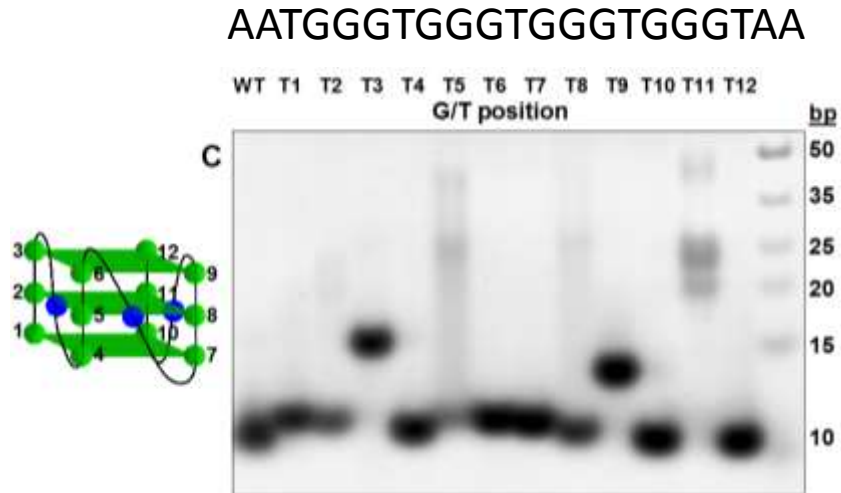
Denaturační x nativní PAGE nukleových kyselin

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

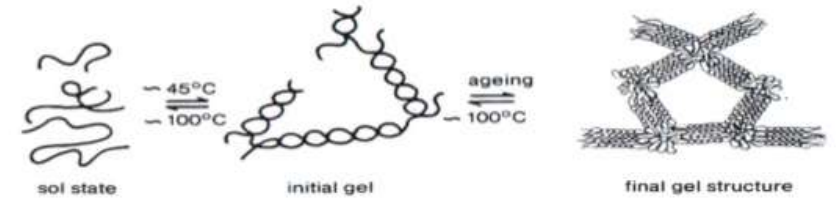
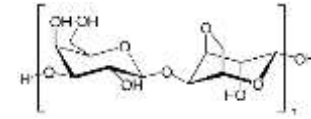
- 20% PAG, 1xTBE, 7M urea
- 500V, 1 h, 50°C
- StainAll



- 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

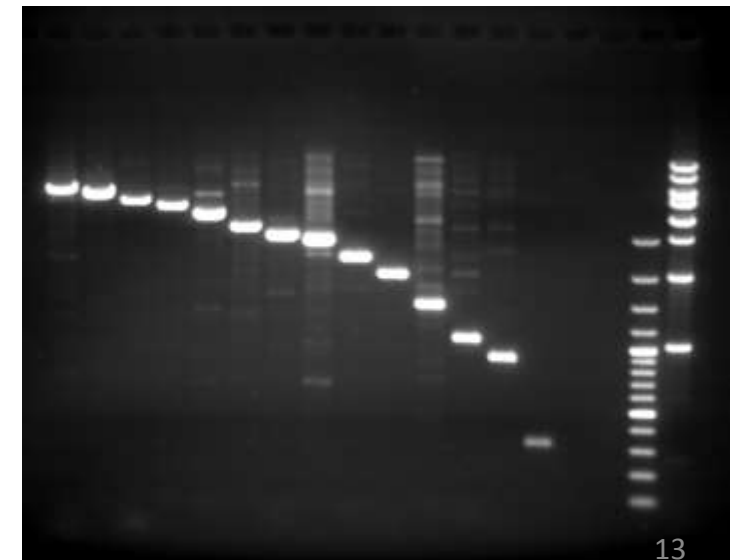
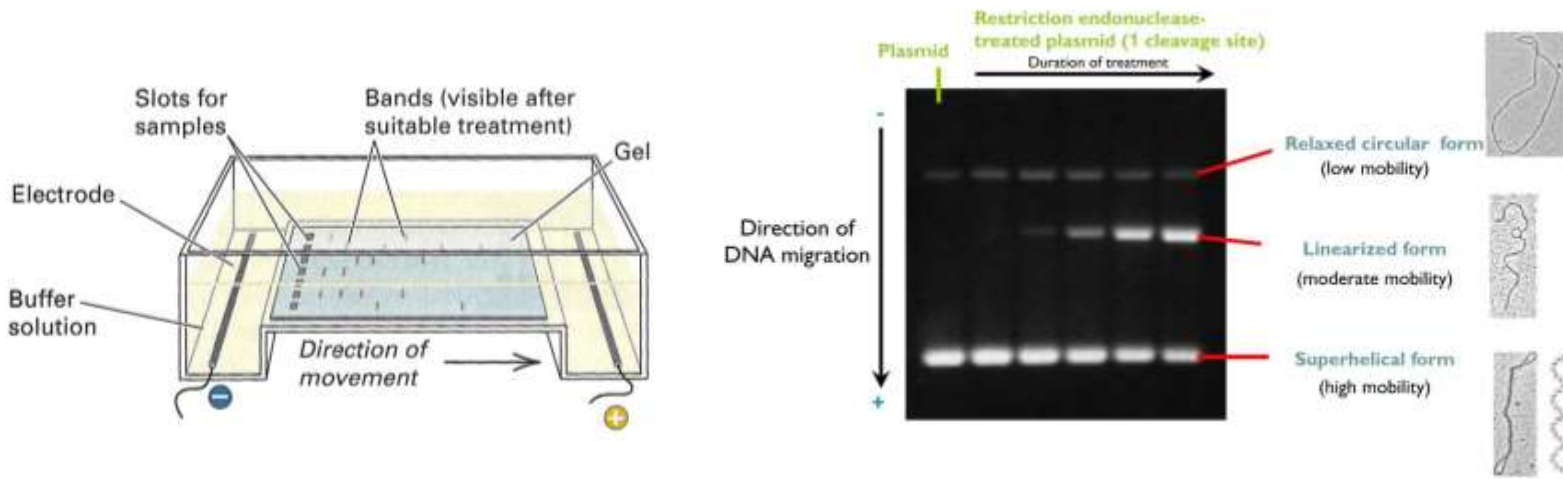
Agarozová elektroforéza nukleových kyselin

- 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



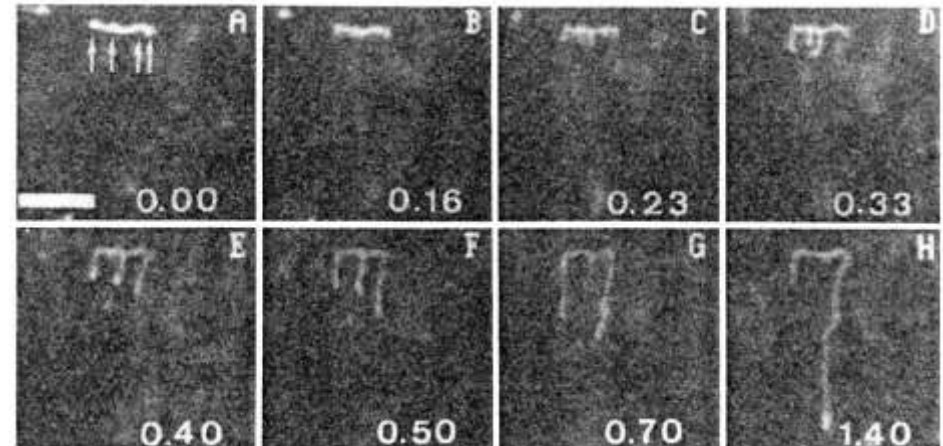
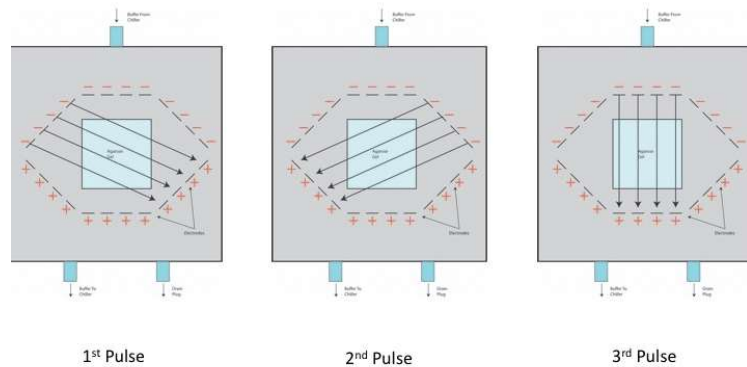
Nativní agarozová elektroforéza PCR amplifikovaných fragmentů promotoru genu *oct4*

- 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

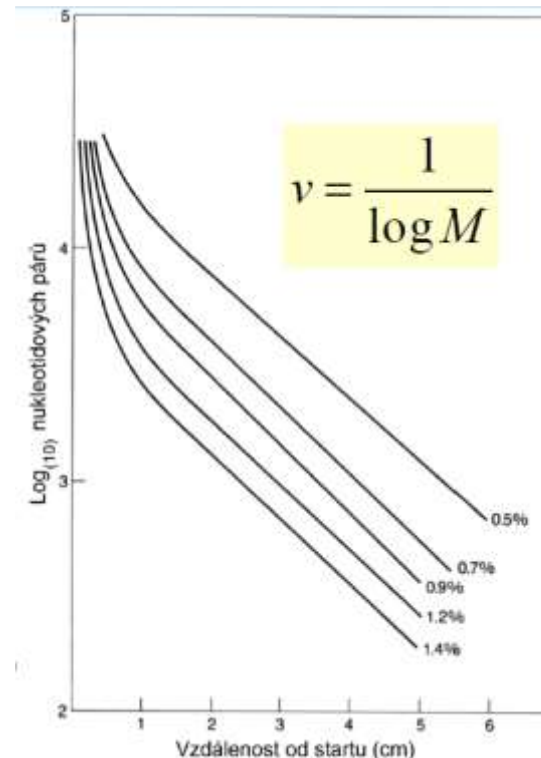
Separace nukleových kyselin

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

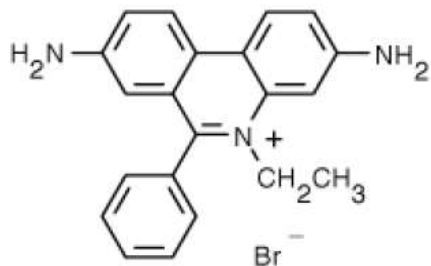
Barva v gelu

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

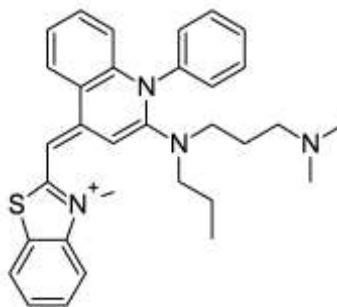
Ethidium bromid

- 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 zháší 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**

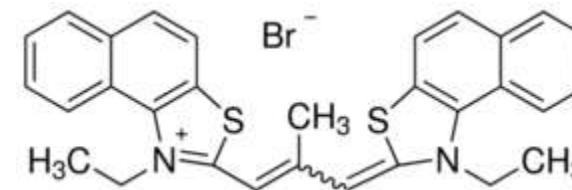


Stříbro

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

Stains All

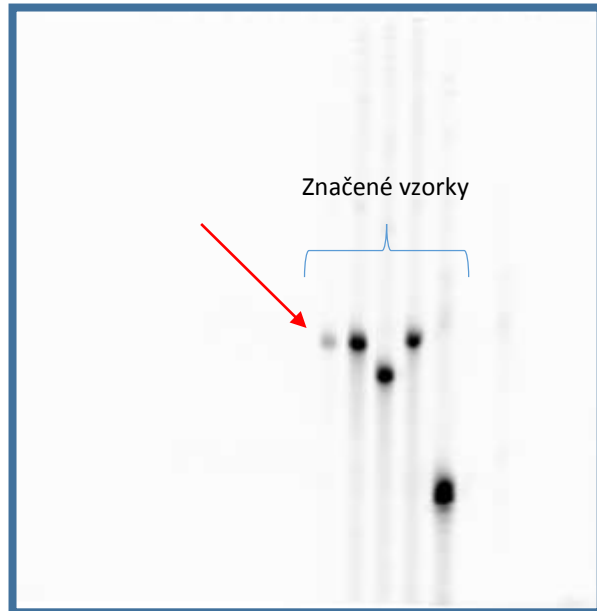
- Přímá vizualizace - viditelné
- RNA, DNA i proteiny
- Citlivost nižší než EtBr
- Vhodné pro akrylamidové gely



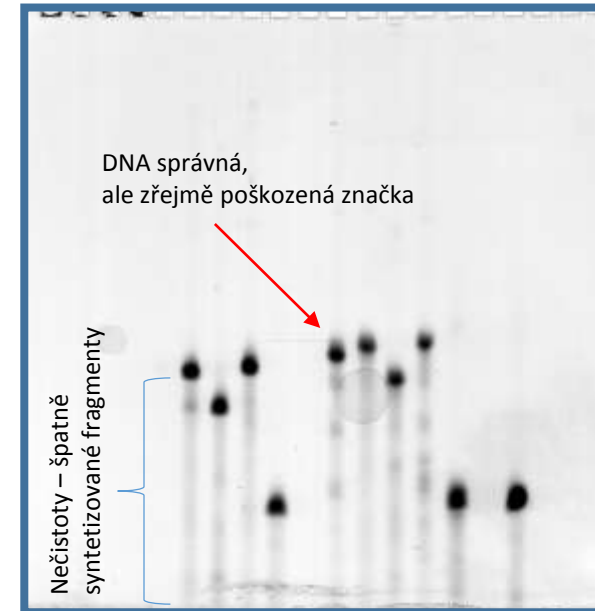
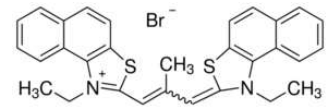
Denaturační PAGE DNA - barvení

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

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



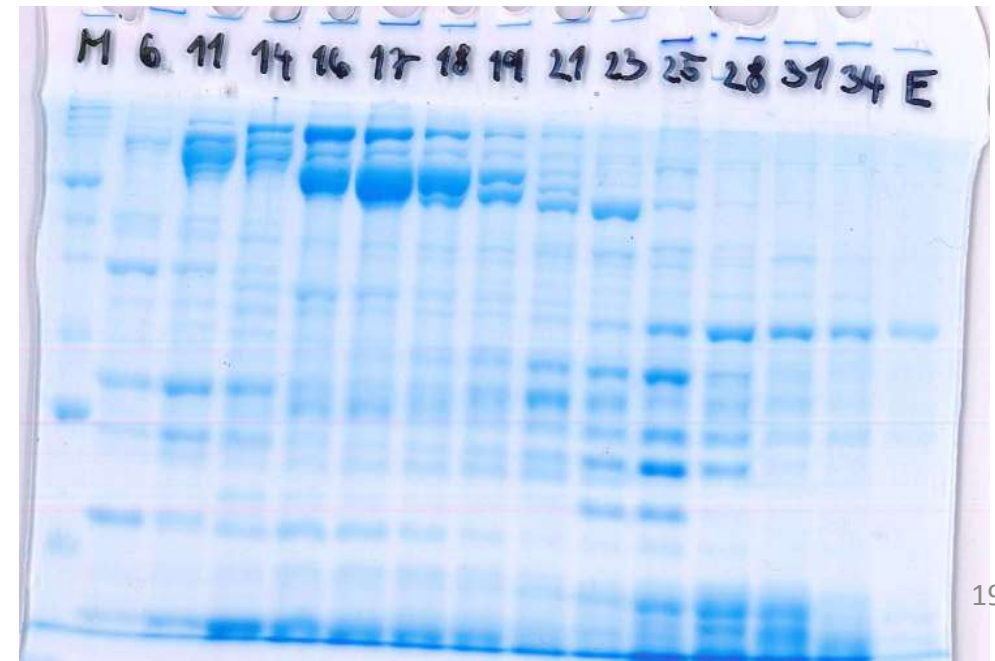
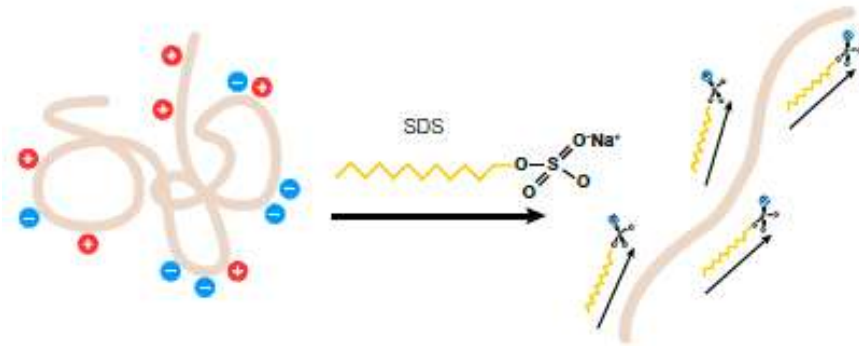
Post-elektroforetické barvení Stains-All
Barví vše
Klasický skener – viditelné světlo



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** (β -merkaptóetanol, dithiothreitol) a následným **varem**

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



Denaturační PAGE proteinů – SDS

Stacking gel

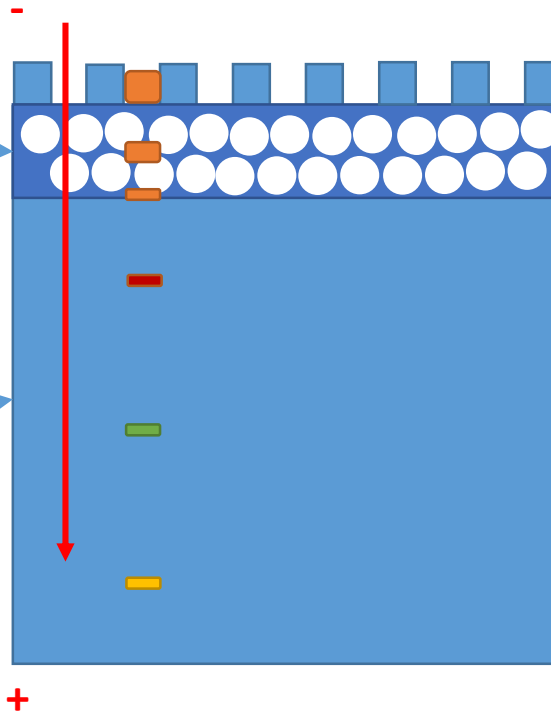
- Zostření směsi proteinů do jednoho úzkého proužku – při následné separaci dle velikosti startují zároveň
- Silně porézní gel (málo akrylamidu)
- cca 5% akrylamid + SDS
- Tris.Cl pufr, pH 6.8

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- – migrace v čele

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

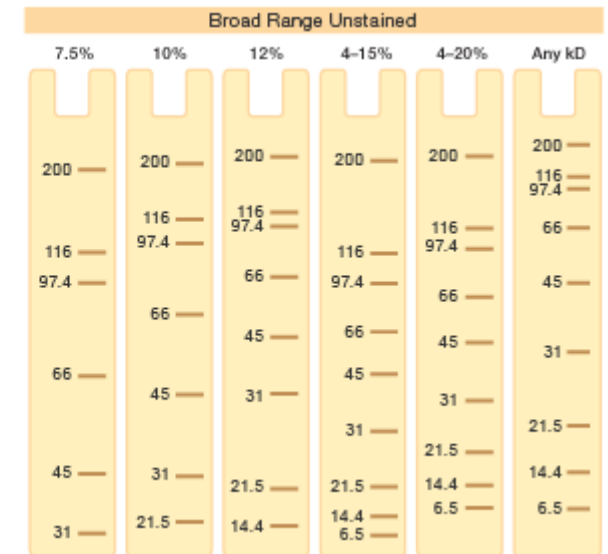
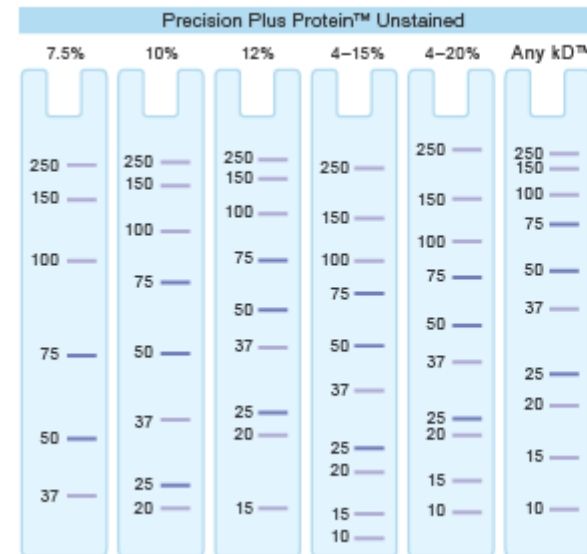
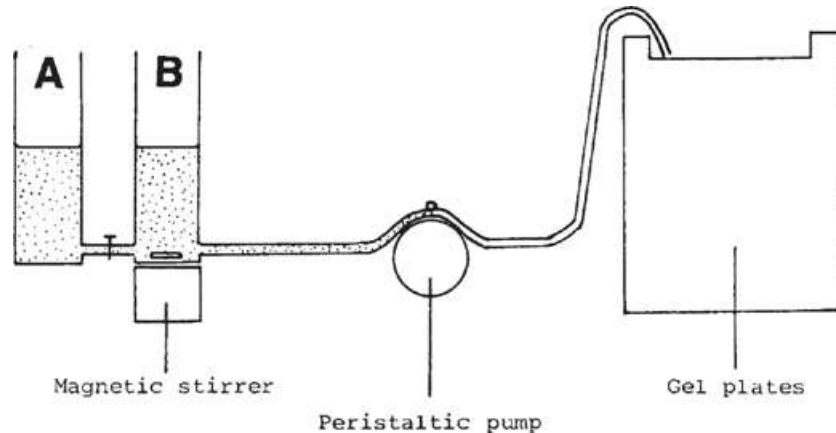
pH 8.8 – glycinát negativně nabitý – rychlý

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



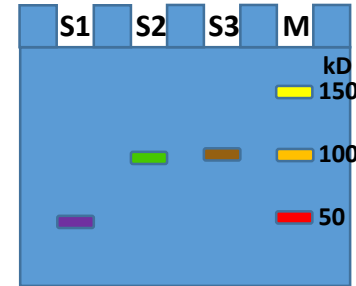
- Sekundární struktura zničena
- Migrace dle velikosti/délky
- 7M močovina + formamid + 50°C
- 100s – 1000s V

Proteiny

S1-4x500AA-pl 5



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



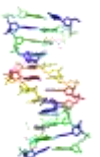
- Vyšší struktury zničeny
- Migrace dle velikosti/délky
- SDS-PAGE - dodecyl sulfát sodný
- 100s V

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

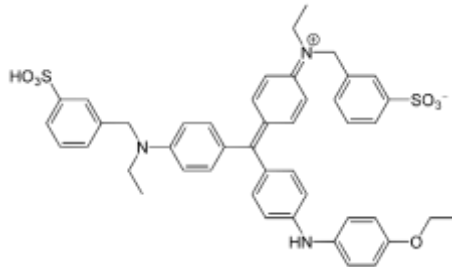
Vizualizace proteinů – SDS-PAGE

Nespecificky

- Barvení všech proteinů v gelu nespecifickým barvivem

Comassie brilliant blue

- Přímá vizualizace - viditelné
- Proteiny – 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

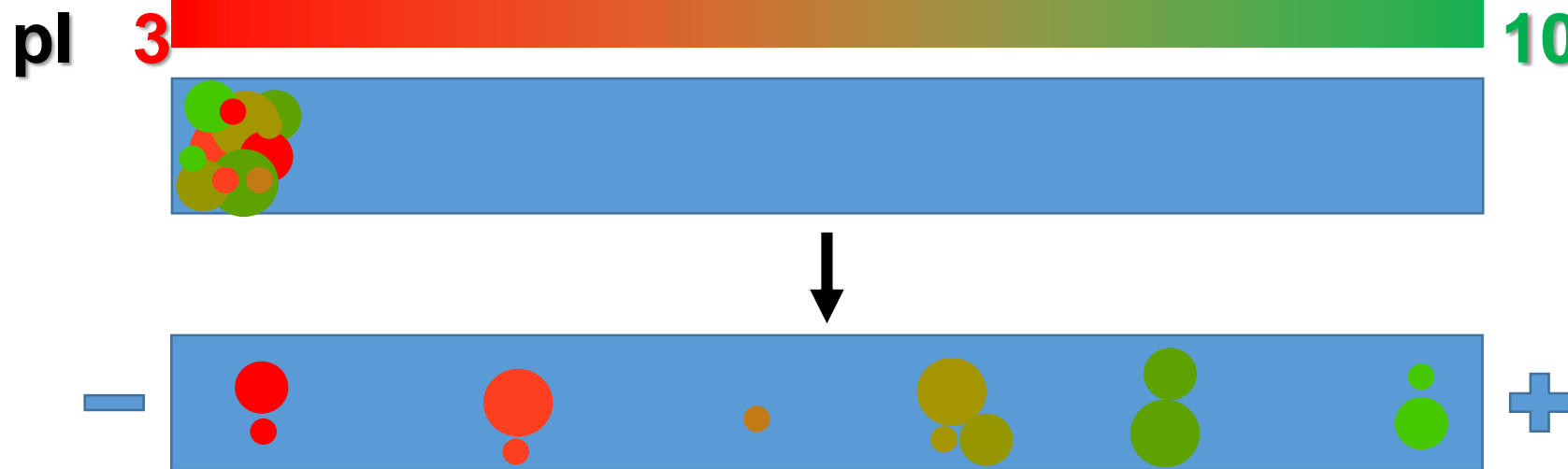
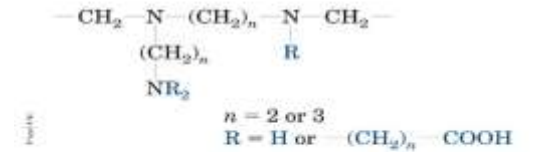
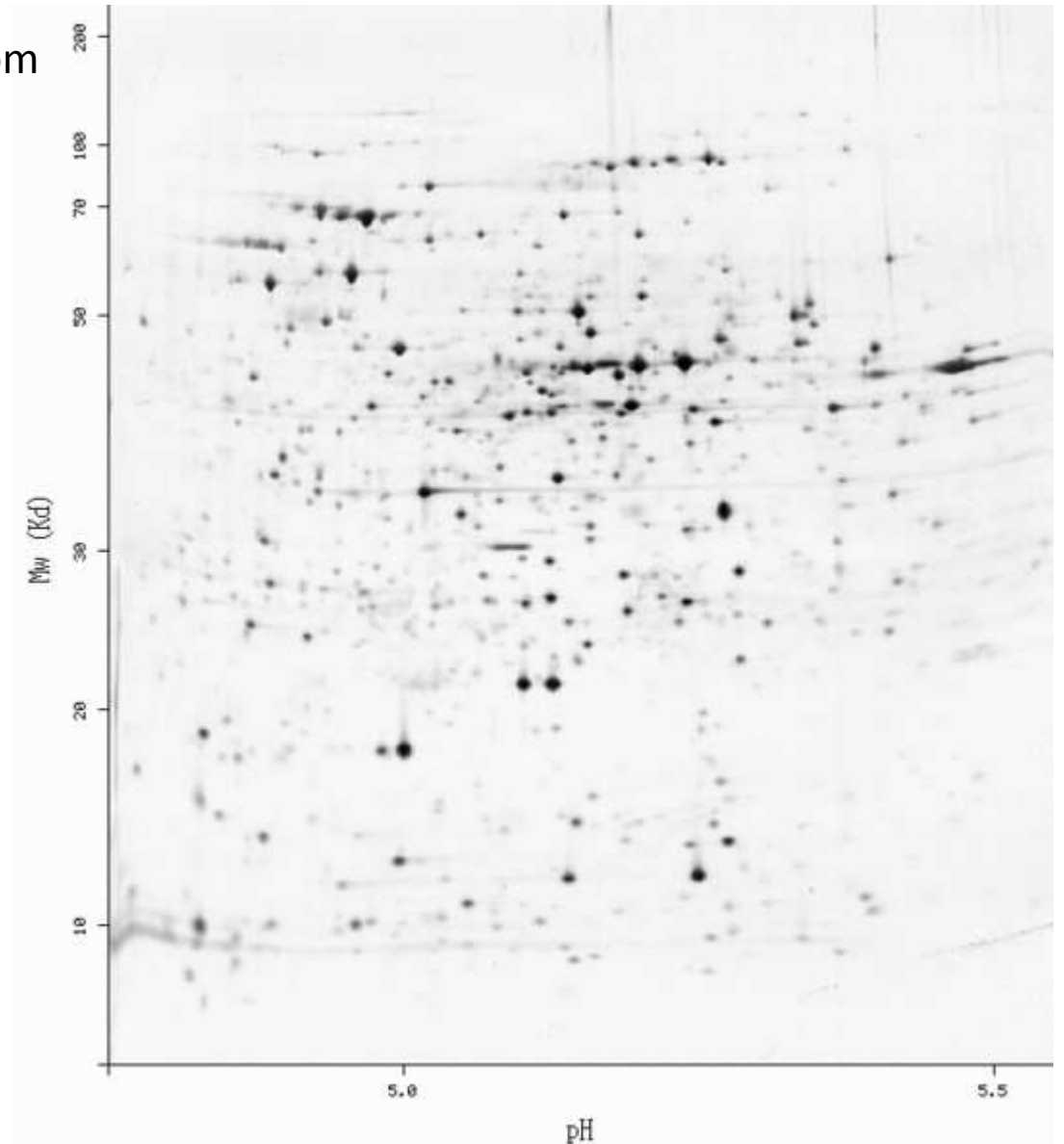
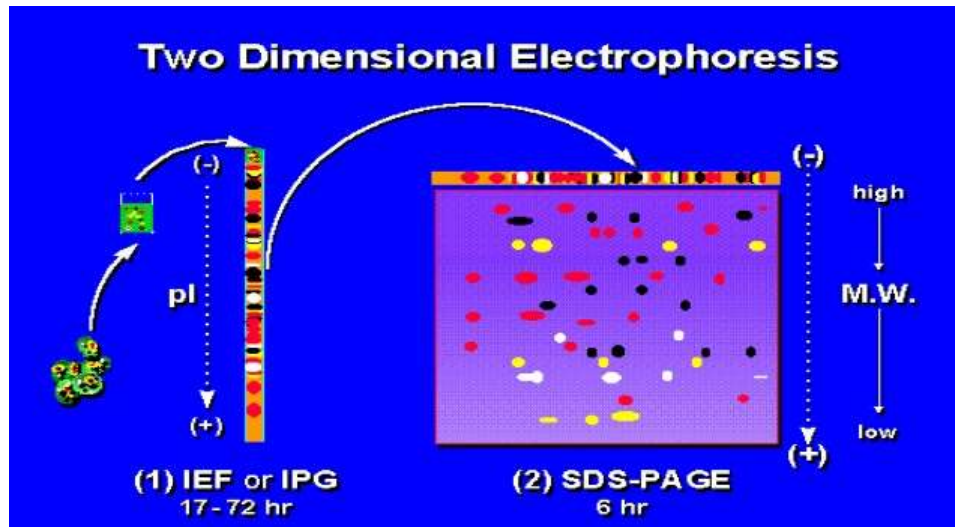


Figure 6-26 General formula of the ampholytes used in isoelectric focusing.



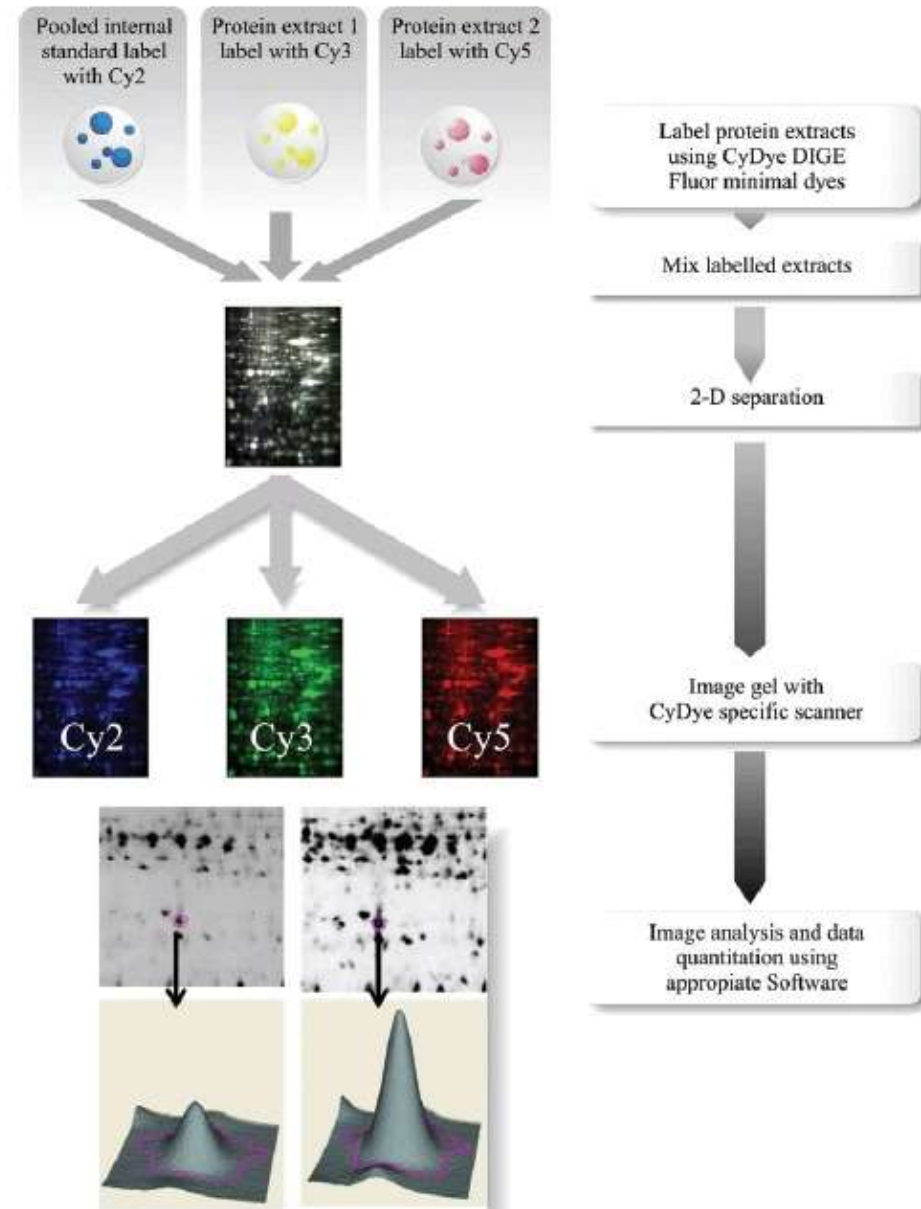
Dvourozměrná (dvoudimenzionální) PAGE

- 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



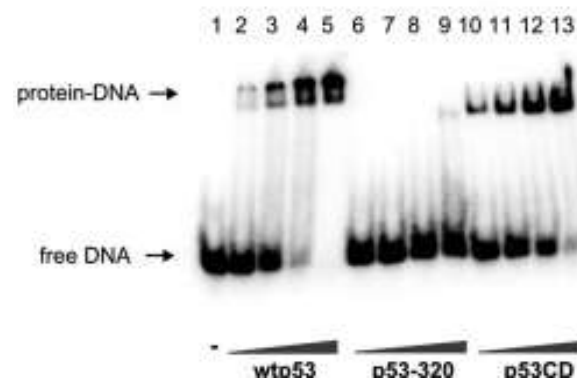
Diferenční 2D gelová elektroforéza (2D-DIGE)

- 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



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

