

# Elektroforetické separační metody



Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů

- **Princip**

- Pohyb nabitých molekul nukleových kyselin v elektrickém poli
- Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny

- **Cíl**

- Dělení molekul na základě rozdílných elektroforetických pohyblivostí

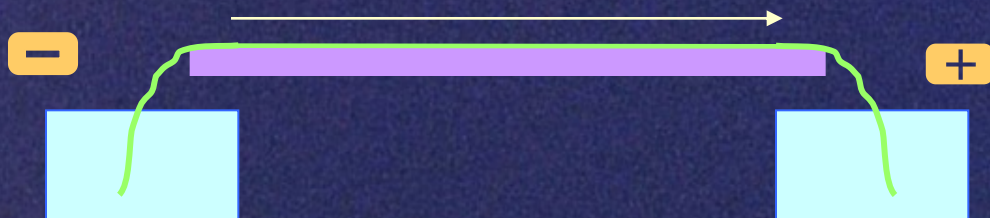
# Používané nosiče



- Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny
  - agarózou
  - polyakrylamidem
- Vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry
- Velikost pórů lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru
- Optimální velikost separovaných molekul
  - agarózové gely 100 bp až 50 000 bp
  - polyakrylamidové 10 až 1000 bp

# Uspořádání gelové elektroforézy

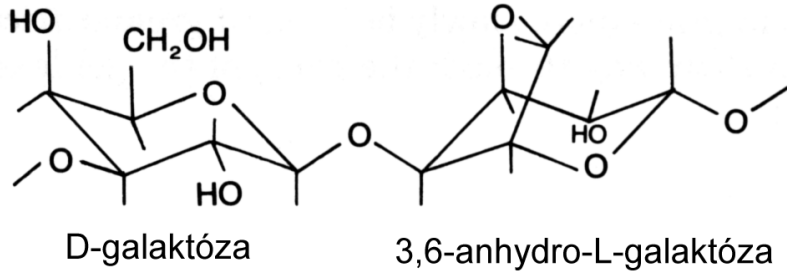
- Horizontální



- Vertikální

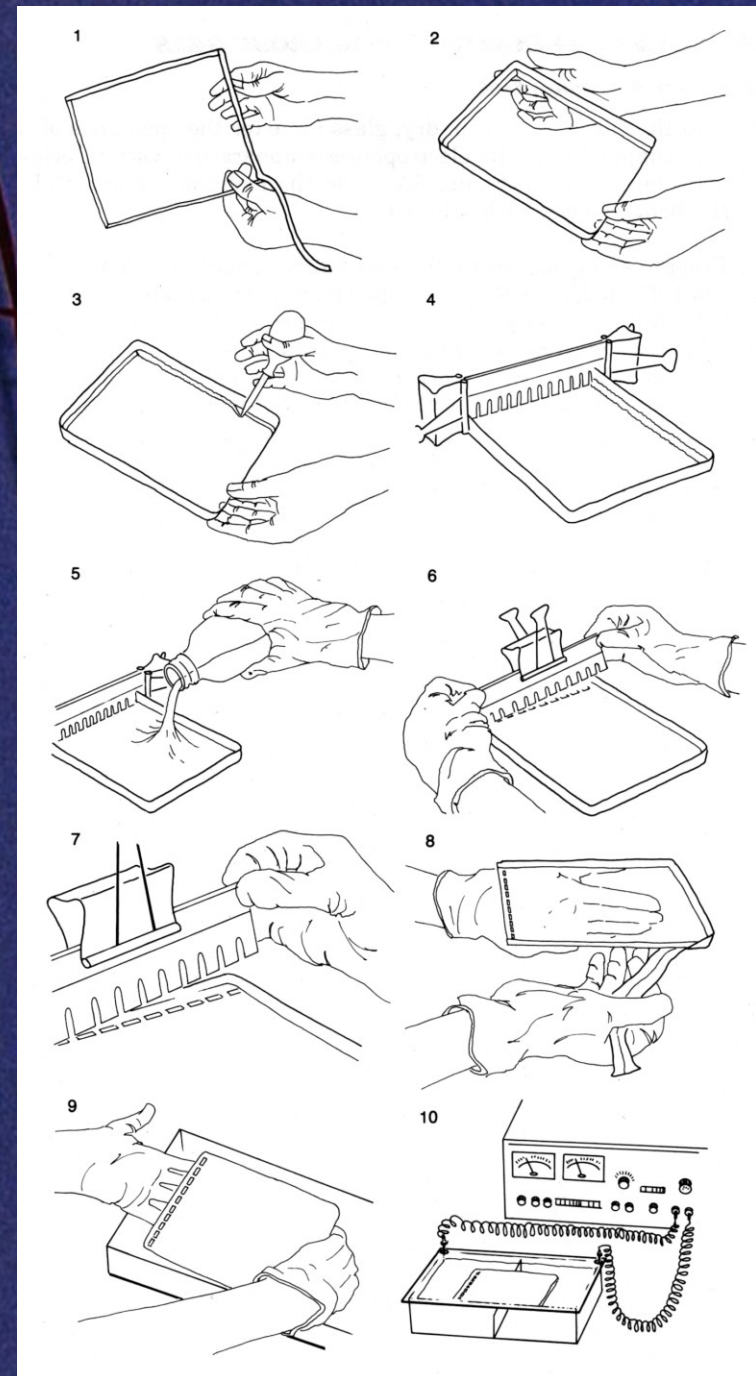
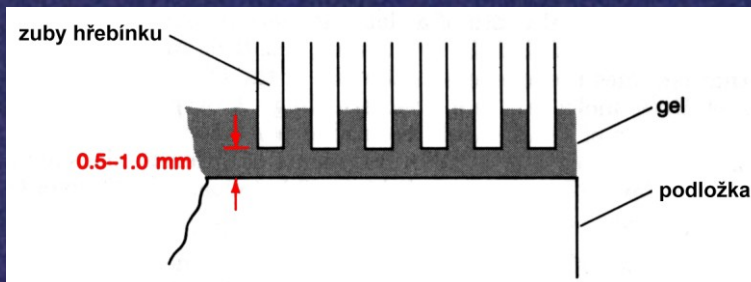


# Agarózové gely

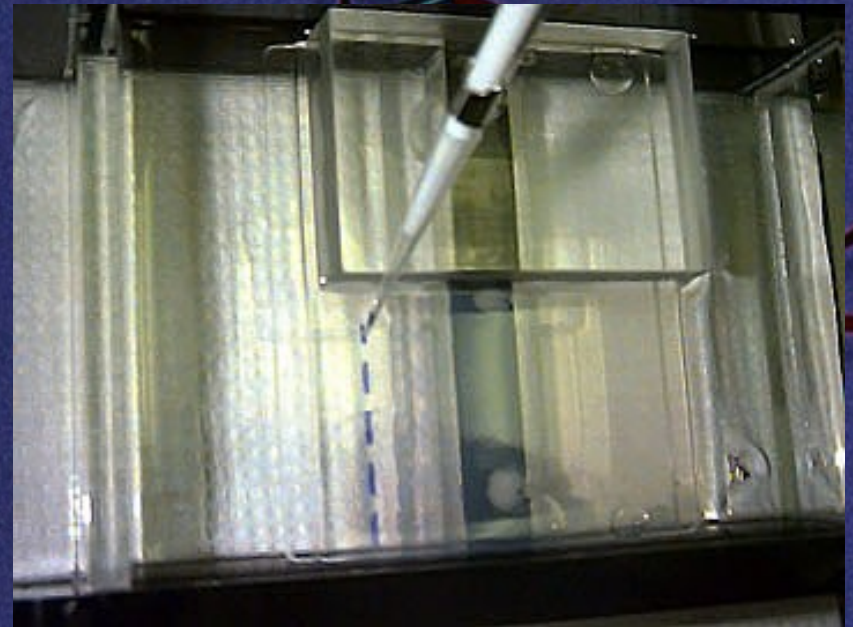
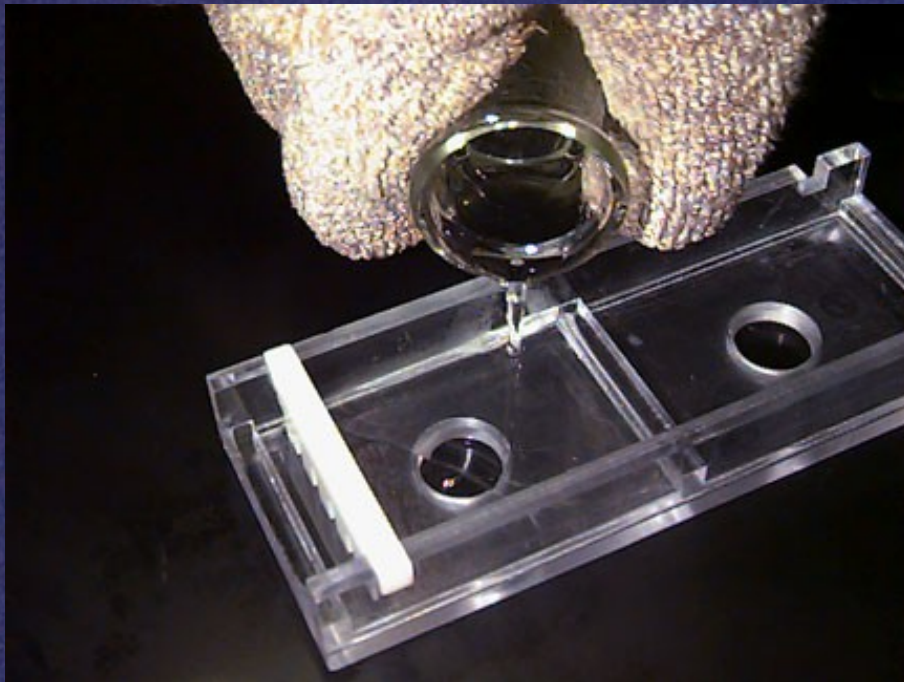
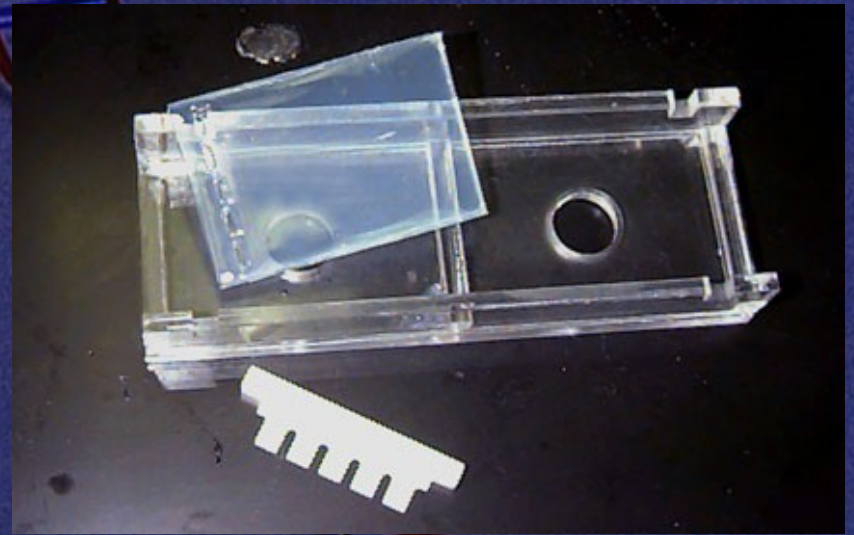
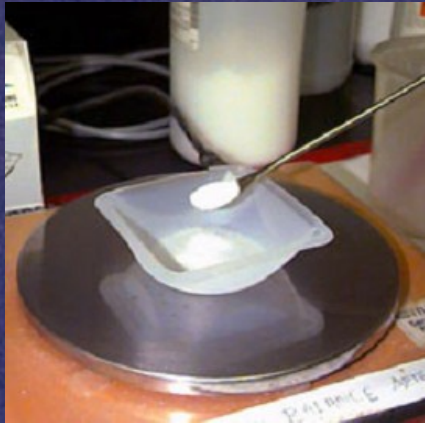


Separáční schopnosti gelu v závislosti na koncentraci agarózy

| Koncentrace agarózy | Rozsah dělení ds DNA |
|---------------------|----------------------|
| 0,3 %               | 5 – 60 kb            |
| 0,6 %               | 1 – 20 kb            |
| 0,7 %               | 0,8 – 10 kb          |
| 0,9 %               | 0,5 – 7 kb           |
| 1,2 %               | 0,4 – 4 kb           |
| 1,5 %               | 0,2 – 3 kb           |
| 2,0 %               | 0,1 – 2 kb           |




# Příprava agaróзовého gelu



# Aparatura pro horizontální elektroforézu



# Příprava polyakrylamidových gelů

- Složení: kopolymer akrylamidu a N,N,- metylenbisakrylamidu
- Monomer je neurotoxin  a mutagen
- Katalyzátor – tetramethylethyldiamin (TEMED)
- Iniciátor – persíran amonný  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- Radikálová polymerace
- V důsledku přítomnosti bifunkčního agens N,N,- metylenbisakrylamidu řetězce kroslinkují a vytvářejí gel

## Separční schopnosti elektroforetických gelů v závislosti na koncentraci akrylamidu

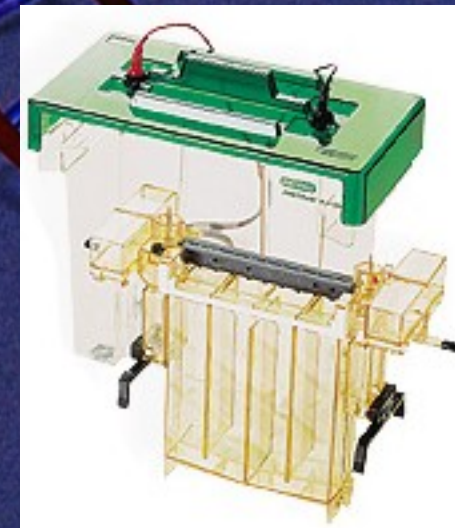
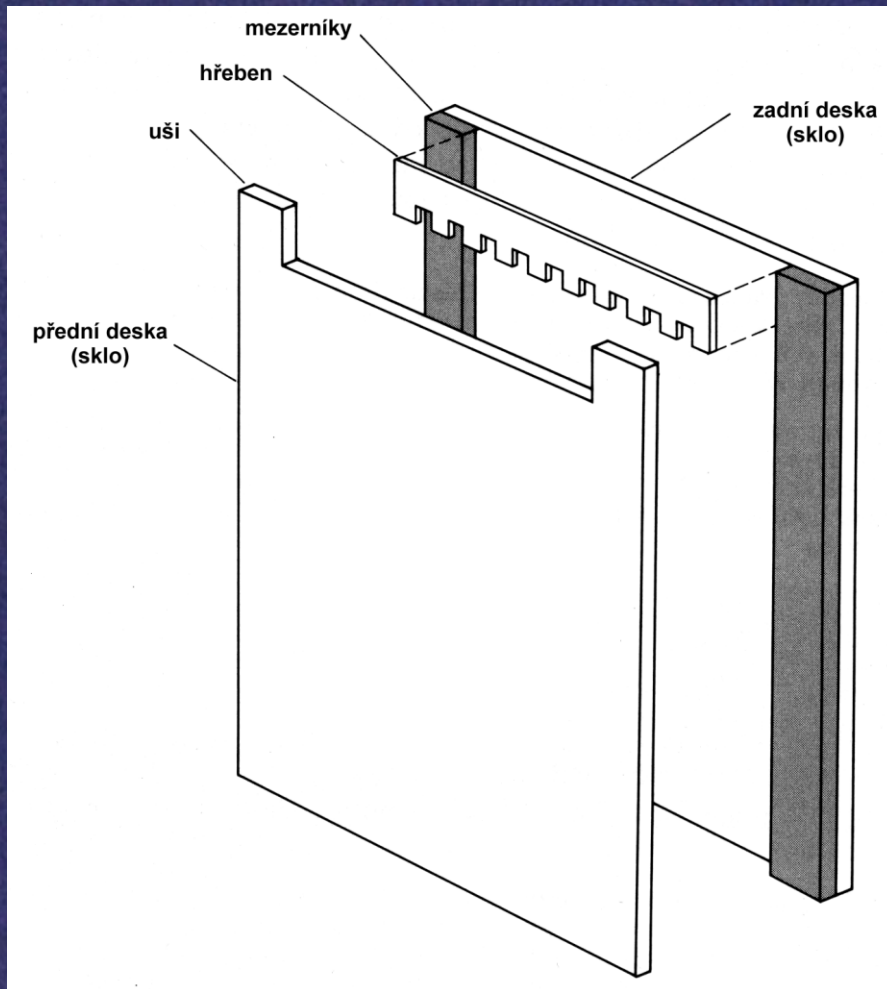
| Koncentrace polyakrylamidu v gelu | Rozsah dělení dsDNA |
|-----------------------------------|---------------------|
| 3,5 %                             | 1000 – 2000 bp      |
| 5,0 %                             | 80 – 500 bp         |
| 8,0 %                             | 60 – 400 bp         |
| 12,0 %                            | 40 – 200 bp         |
| 15 %                              | 25 – 150 bp         |
| 20 %                              | 6 – 100 bp          |





# Aparatura pro vertikální elektroforézu

Polyakrylamidové gely se připravují obtížněji než agarózové.  
Obvykle se lijí mezi dvě skla oddělená mezeríky.

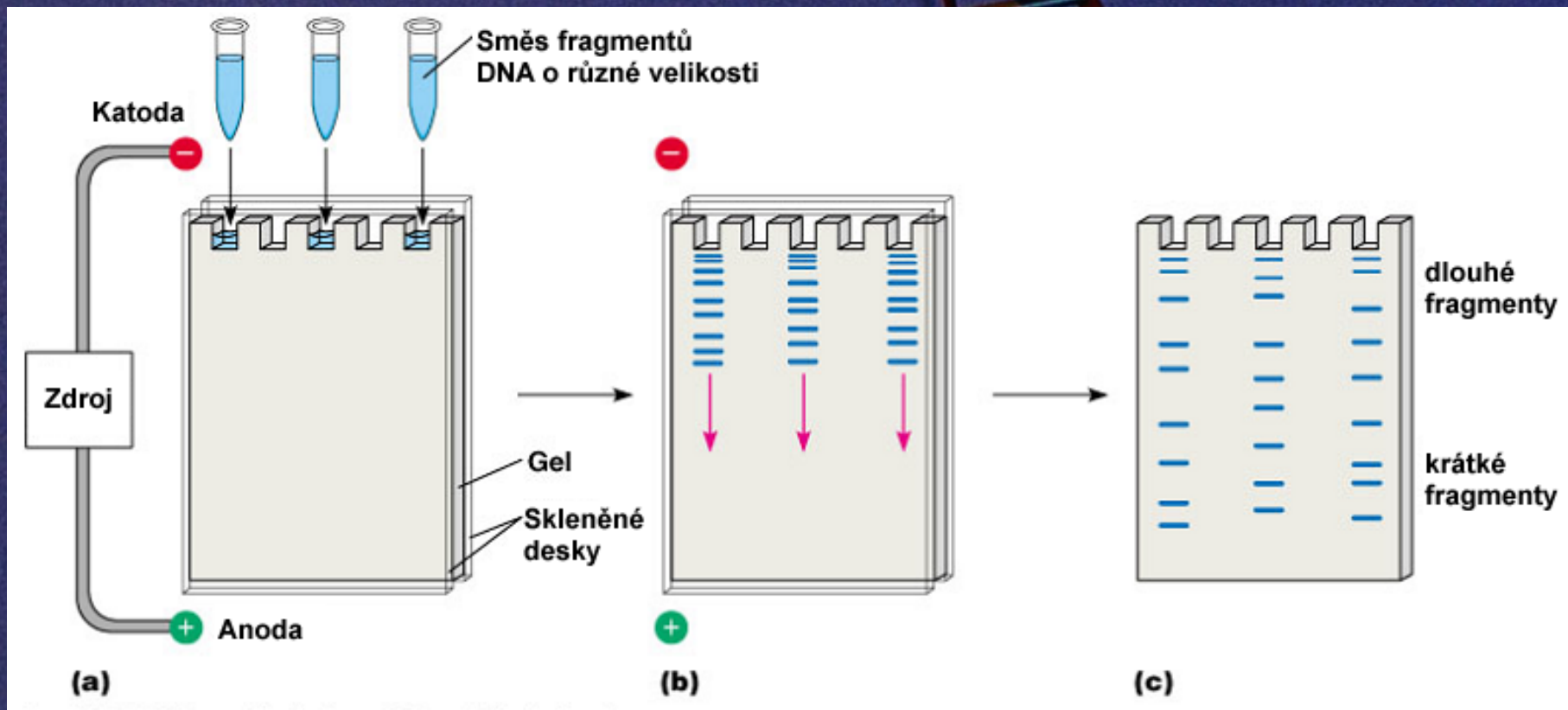


# Pufry pro nanášení vzorků



- Nanášecí pufry slouží při elektroforéze NA
  - Zvýšení hustoty vzorku - to umožní, že DNA klesne na dno jamky
  - Obarvení vzorku pro snadnější nanášení
  - Přidání pohyblivého barviva do vzorku pro možnost sledování průběhu elektroforézy
- Rozdělení nanášecích pufků
  - Založené na sacharóze
  - Založené na glycerolu
  - Kombinované

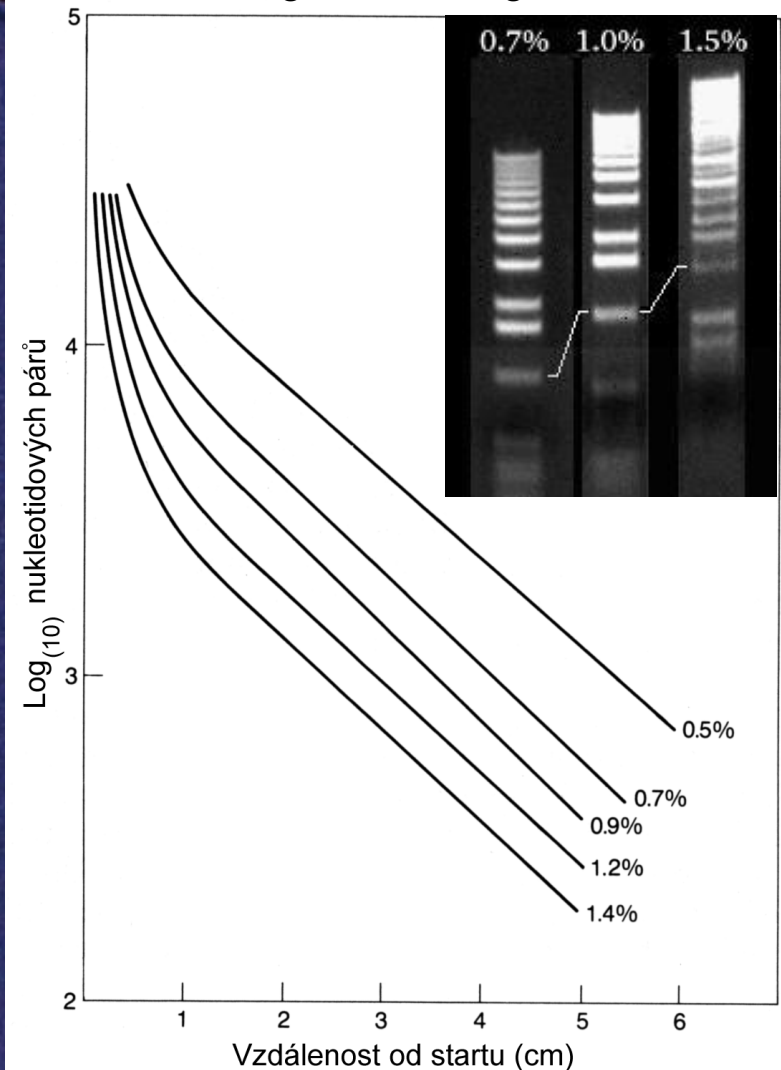
# Provedení elektroforézy



# Elektroforetická pohyblivost DNA

- Rychlost pohybu molekul DNA v gelu označovaná jako **elektroforetická pohyblivost je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti.**
- Velikost fragmentu DNA o neznámé velikosti lze proto stanovit srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí fragmentů o známé velikosti, označovaných jako **standardy velikosti** nebo **hmotnostní standardy.**
- Těmi bývají většinou restriční fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž přesná velikost byla stanovena sekvencováním, např. fága lambda.

Vztah mezi velikostí DNA a její elektroforetickou pohyblivostí v agarózovém gelu



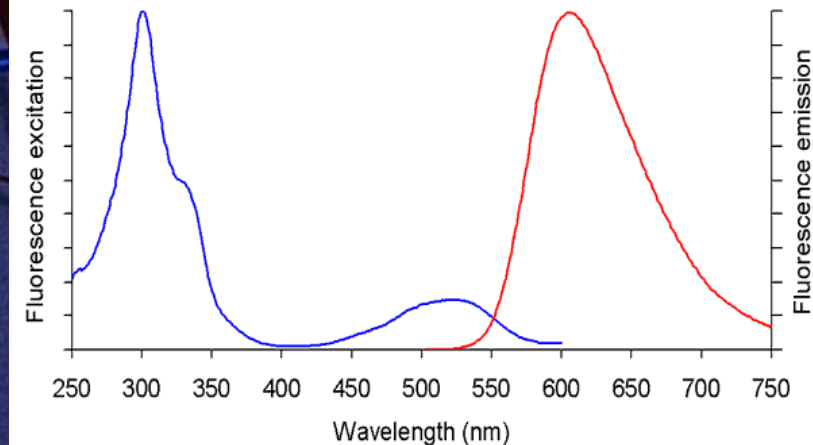
# Metody detekce



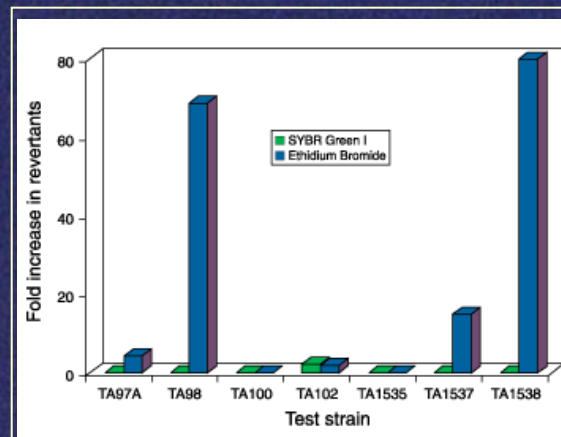
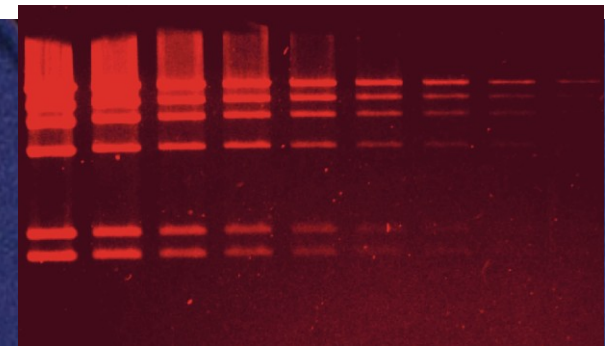
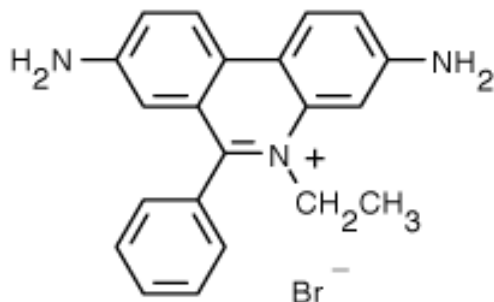
- Po proběhnutí elektroforézy je třeba identifikovat polohy rozdělených molekul, které nejsou pouhým okem viditelné.
- Molekuly DNA lze snadno zviditelnit
  - Přímým barvením vhodným barvivem
    - Nejjednodušší a nejlevnější
    - Barvivo se váže na DNA
    - Zbarvení je proporcionální koncentraci DNA a tím i velikosti fragmentů
      - Příklad: Spolehlivě detekovatelné množství DNA v proužku na gelu je 1-2 ng. Aby byl detekován fragment o velikosti 200 bp pocházející ze sekvence dlouhé 20 kb, musí být do jamky na gel naneseo 200 ng DNA.
  - Koncovým značením  $^{32}\text{P}$  označených dNTP připojených na konce fragmentů DNA
    - Lze aplikovat jen na vysoce přečištěné sekvence
    - Každý fragment má stejný počet konců, intenzita značky není závislá na délce fragmentu
    - Polohy proužků na gelu se znázorní autoradiograficky
    - Je citlivější než barvicí metody, ovšem dražší
  - Hybridizací se značenou sondou

# Fenantridinová barviva – Etidium bromid

- Interkalační barviva vázající se bez sekvenční specifity na nukleové kyseliny s četností 1 molekula na 4–5 bp DNA
- Mutageny a karcinogeny
- EtBr a PI se váže jak na DNA, tak na RNA
- Po vytvoření komplexu EtBr-DNA je pozorována ~20 - 30 vyšší fluorescence
- Citlivost 1-5 ng DNA, 5 ng RNA (254 nm)
- Polyakrylamid zhasí fluorescenci EtBr, není možné detekovat méně jak 10 ng DNA

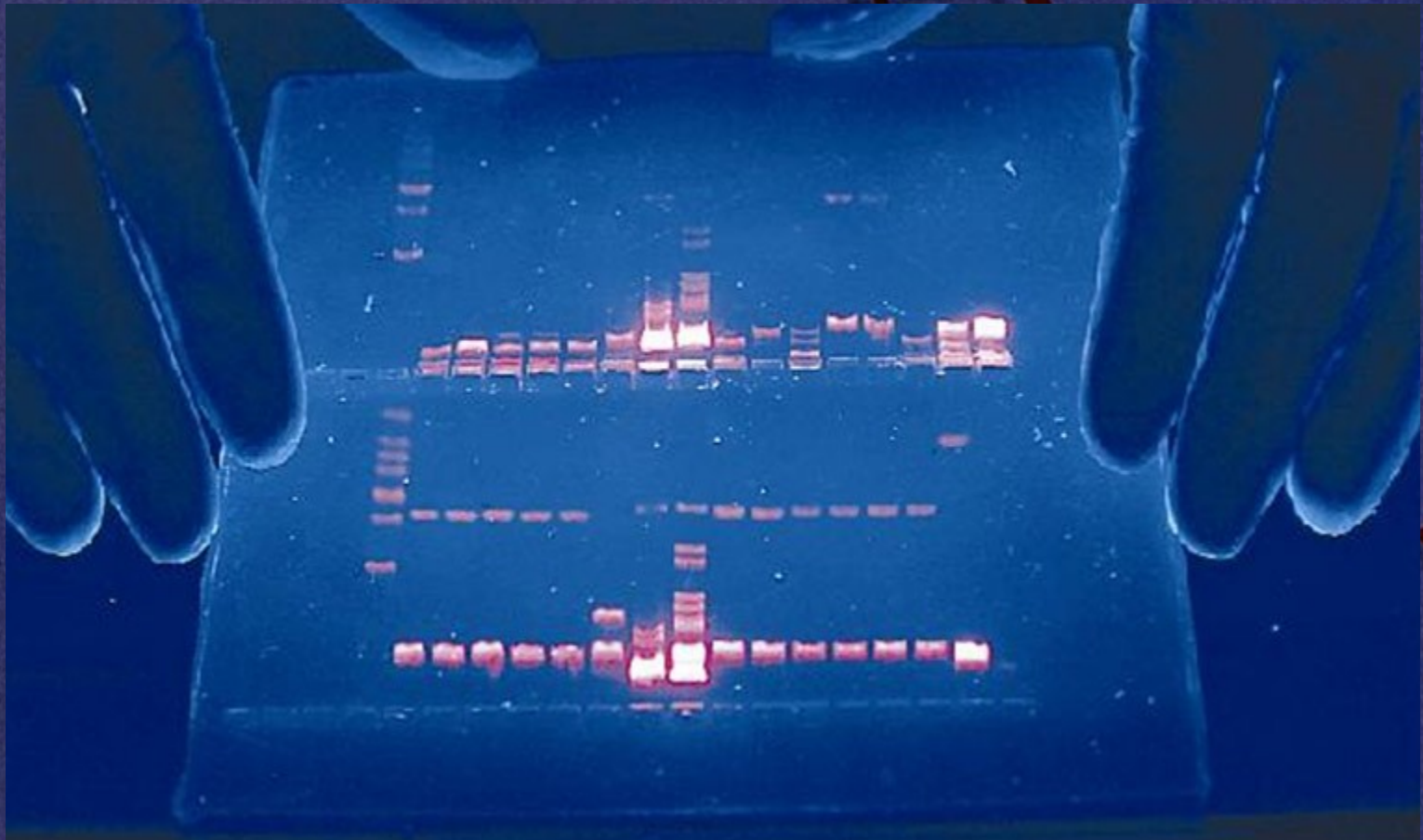


Etidium bromid (fenantridinium, 3,8-diamino-5-etyl-6-fenyl-bromid)



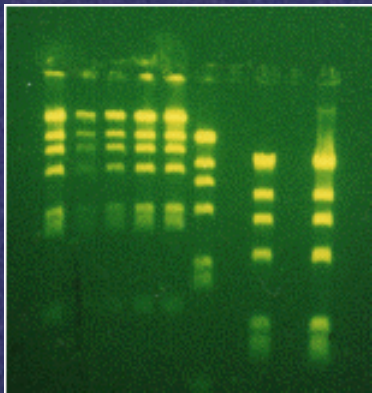
Srovnání výsledků  
Amesova testu  
u EtBr a SYBR

**Agarózový gel  
obarvený etidiumbromidem  
pozorovaný pod UV-světlem**

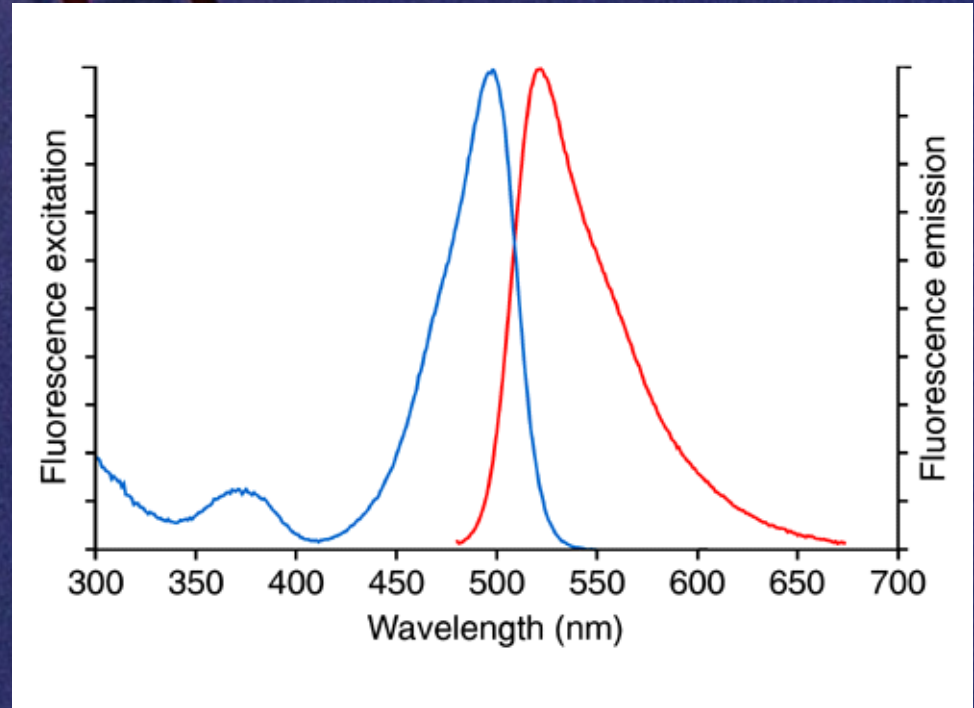
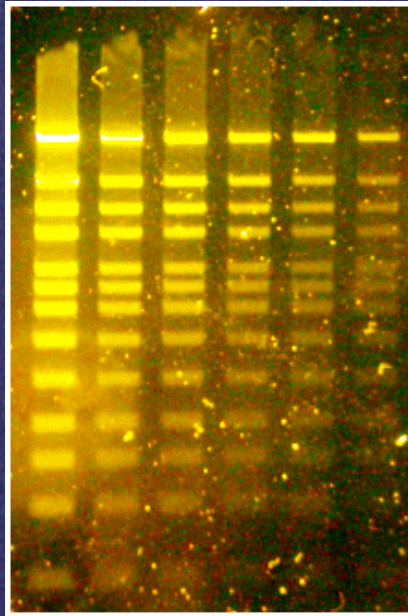


# Komerční kyaninová barviva - SYBR® Green a SYBR® Gold

SYBR Green I

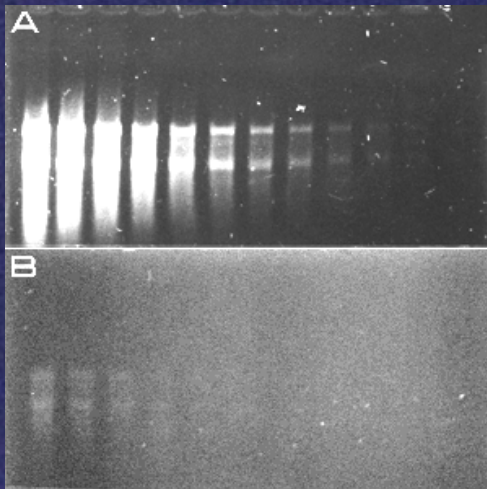


SYBR Gold



- vysoká afinita k NA
- 1000x vyšší fluorescence po vazbě na NA
- 25 – 100x citlivější než EtBr
- Vhodná pro ds DNA, ssDNA a RNA
- 60 pg dsDNA nebo 1 ng RNA (při 300 nm)
- mnohem méně mutagenní než EtBr

SYBR

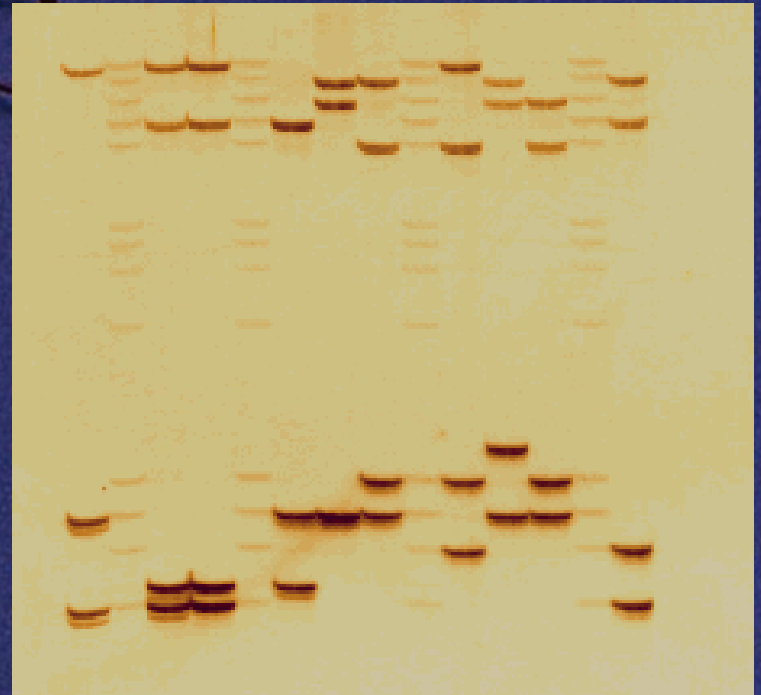


EtBr



# Barvení stříbrem

- Barvení NA stříbrem má mírně vyšší citlivost než barvením EtBr
- Citlivost 100 pg DNA v PA
- dsDNA, ssDNA i RNA
- Lepší citlivost vykazuje u **polyakrylamidových gelů** než u agarózových
- Barvení zahrnuje 3 kroky:
  - Fixace (metanol, ledová kyselina octová a glycerol)
  - Barvení (uhličitan sodný, dusičnan amonný, **dusičnan stříbrný** a kyselina wolframovokřemičitá)
  - Zastavení (ledová kyselina octová)



# Dokumentace

- Používané vlnové délky UV-světla
  - 254 nm
  - 302 nm
  - 365 nm

