

ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

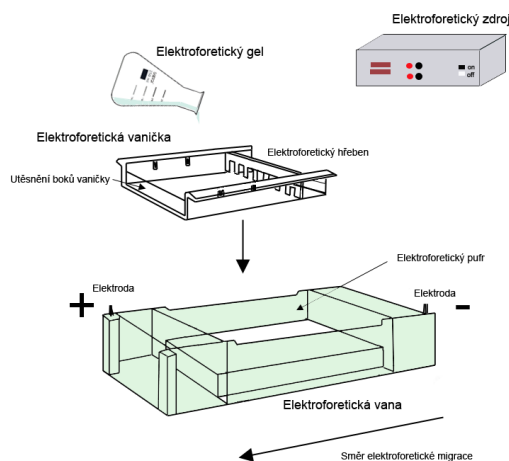
Fragmenty nukleových kyselin lze dle jejich velikosti rozdělit elektroforézou. Elektroforéza využívá rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů, danou právě jejich rozdílnou velikostí. Nukleová kyselina nese díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje od záporného pólu (katody) ke kladnému (anodě).

- Při elektroforéze se separují molekuly nukleových kyselin na základě své délky a konformace.
- Obvykle platí, že delší fragmenty migrují pomaleji než kratší.
- Je využívána gelová elektroforéza, kdy se molekuly nukleových kyselin separují buď v agarosovém či polyakrylamidovém gelu.

Základní kroky při ELFO

1. Příprava agarosového nebo polyakrylamidového gelu. Koncentrace gelu se odvíjí od velikosti separovaných molekul.
2. Vzorky se nanesou do jamek v gelu, které byly vytvořeny pomocí tzv. hřebínku.
3. Samotná elektroforetická separace. Migrace v gelu je při elektroforéze kontrolována pomocí barviva přítomného v nanášecím pufru, se kterým je roztok DNA před nanášením na gel smíchán.
4. Ukončení elektroforetické separace. Vizualizace separované DNA (nejčastěji obarvení fluorescenčním barvivem a vizualizace pod UV lampou).

SCHÉMA APARATURY PRO AGAROSOVOU ELEKTROFORÉZU



Agarosová ELFO versus polyakrylamidová ELFO (PAGE)

- Pro separaci DNA je vzhledem k menší náročnosti provedení agarosová elektroforéza v porovnání s polyakrylamidovou elektroforézou (PAGE) preferovanou metodou.

- Využití polyakrylamidové versus agarosové elektroforézy se především odvíjí od velikosti fragmentů, které chceme separovat. Polyakrylamidová elektroforéza nastupuje v případech, kdy separujeme krátké fragmenty DNA (cca < 200bp).

Polyakrylamid (poly(2-propenamid)) je polymer tvořený z akrylamidových podjednotek zesíťovaných N,N'-metylenbisakrylamidem. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě pomocí volných radikálů, které dodává persulfát amonný (APS), způsobující homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada TEMED (tetrametylendiamin), který katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Při práci s akrylamidem je třeba obezřetnosti, protože působí jako neurotoxin. Výběrem vhodné koncentrace akrylamidu a bisakrylamidu lze ovlivňovat velikost pórů gelu a tím délku separovaných molekul. Se zvyšující se koncentrací těchto látek se póry gelu stávají menšími a gel se hodí pro separaci menších molekul, viz. tabulka. Pro PAGE je jako elektroforetický pufr využíván TBE. PAGE je buď ve formě denaturační s přidavkem denaturační látky, jako např. močoviny, nebo ve formě nedenaturační, tzv. nativní.

Agaróza. Standardní agarosová elektroforéza se používá pro separaci fragmentů od 100 bp do 50 kb. Agaróza je lineární sacharidový polymer D-galaktosidázy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranozy. Vyrábí se z agaru izolovaného z mořské řasy odstraněním agaropektinu. Ačkoliv by agaróza měla být teoreticky zcela nenabitá, v praxi může obsahovat příměsi nabitých sulfátových či pyruvátových skupin. Tyto skupiny zpomalují pohyb DNA - tento jev se nazývá elektroendoosmóza (EEO). Pro elektroforézu nukleových kyselin jsou preferovány agarózy s nízkou elektroendoosmózou (low EEO). Naopak agarózy s vyšší EEO se používají např. pro imunoprecipitaci. Na trhu je dostupné široké spektrum agaróz vhodných k jednotlivým typům použití, např. agarózy zajišťující vysoké rozlišení při separaci velmi krátkých fragmentů, agarózy pro separaci pulzní elektroforesou, tzn. separaci velmi dlouhých fragmentů či chromosomálních fragmentů či tzv. „low melting“ agarózy, tedy agarózy s bodem tání nižším než je bod tání většiny nukleových kyselin (okolo 65°C), které jsou vhodné pro extrakci nukleové kyseliny z gelu.

Velikost separovaných fragmentů a koncentrace gelu

Koncentrace gelu je důležitým faktorem pro mobilitu molekul. Čím koncentrovanější je gel, tím je separace pomalejší, z čehož vyplývá, že vyšší koncentrace gelu zajistí lepší separaci krátkých fragmentů. Koncentrace gelu závisí na typu fragmentů DNA, které chceme separovat. Koncentrace gelu udává velikost pórů v gelu, kterými molekuly DNA procházejí. Koncentrací gelu lze proto ovlivňovat separaci a tedy i rozlišení velikosti fragmentů.

- Vyšší koncentrace gelu zajistí lepší separaci krátkých fragmentů.
- Nižší koncentrace gelu zajistí lepší separaci dlouhých fragmentů.

Standardně pro většinu aplikací je využívána koncentrace 1%. Nicméně, např. pro kvalitní separaci 5-10 kb DNA fragmentů je využívána 0,7% agarosa, gelem s 2% zajistíme jemnější rozlišení krátkých fragmentů 0,2-1 kb. Pro krátké fragmenty můžeme při použití speciální agarózy o nízkém bodu tání připravit až 4 % gel, který umožní rozlišení fragmentů o velikosti okolo 200 bp, lišící se 15 páry bází. Pokud vyžadujeme ještě jemnější rozlišení krátkých fragmentů, musíme použít polyakrylamidový gel a vertikální elektroforézu. Stejně tak i pro kvalitní separaci velmi dlouhých fragmentů je nutné využít speciální elektroforézu, tzv. pulsní elektroforézu (pulse field gel electrophoresis (PFGE)).

Vliv konformace DNA

Separace molekul nukleových kyselin je významně ovlivněna jejich konformací. Platí, že méně spiralizovaná DNA migruje v gelu pomaleji než superspiralizovaná DNA, která je díky spiralizaci kompaktnější a póry v gelu tak snadněji procházející. Toto lze pozorovat při separaci plasmidové DNA.

Velikost elektrického napětí při elektroforetické separaci

Optimální velikost elektrického napětí při elektroforéze se udává jako 5-8 V/cm mezi elektrodami u agarosové elektroforézy či 1-8 V/cm u polyakrylamidové elektroforézy. Přitom platí, že

- při nízkém napětí se rychlost migrace proporcionálně mění s elektrickým napětím. Tzn., platí, že s rostoucím elektrickým napětím se nukleové kyseliny pohybují rychleji.
- Od určité hodnoty napětí ovšem také platí, že čím je napětí vyšší, tím klesá efektivita separace dlouhých fragmentů a klesá tak kvalita rozlišení.
- Při příliš vysokém napětí rovněž dochází vlivem produkce tepla k deformaci gelu a tím nerovnoměrné separaci jednotlivých fragmentů a deformaci proužků.
- Naopak pokud je napětí příliš nízké, je nízká rychlost separace a nukleové kyseliny tak mají tendenci difundovat do okolí, což vede k neostrým, rozmazaným proužkům.

Elektroforetické pufrů

Mobilita při elektroforéze je ovlivněna složením elektroforetického pufru, a to především obsahem solí. Bez přítomnosti solí je elektrická vodivost minimální a DNA se pohybuje jen velmi stěží. Obsah solí v elektroforetickém pufru musí být optimální. Pokud je příliš vysoký, elektrická vodivost je vysoká a při elektroforéze dochází k uvolňování velkého množství tepla, což vede

k deformaci gelu. Pro agarosovou separaci se standardně používá pufr TAE (Tris-Acetate-EDTA) nebo pufr TBE (Tris-Borate-EDTA).

- Pufr TAE poskytuje rychlejší elektroforetickou separaci lineárních molekul a lepší rozlišení superspiralizované nukleové kyseliny.
- Naproti tomu pufr TBE má silnější pufrovací kapacitu při déle trvajících elektroforézách či elektroforézách běžících při vysokém napětí. Při separaci v polyakrylamidovém gelu se používá TBE.

Disociační pufry: disociační pufry se používají pro rozrušení sekundárních struktur, tj. denuraci dvouřetězcových molekul, které jsou formovány v případě jednořetězcové nukleové kyseliny. Jako disociační agens se využívá nejčastěji močovina nebo formamid.

Kontinuální a diskontinuální pufrovací systém

Kontinuální systém. V případě kontinuálního systému je složení pufru, který je použit na přípravu gelu identické s pufrem, který je v elektroforetické vaně. Výsledkem separace při kontinuálním pufrovacím systému jsou proužky separované DNA, které jsou poněkud širší a neostré, vedoucí k poněkud horší kvalitě rozlišení než u diskontinuálního pufrovacího systému. Kontinuální systém se používá u většiny aplikací agarosové elektroforézy.

Diskontinuální systém. Diskontinuální systém se využívá především u polyakrylamidové elektroforézy. U tohoto systému je složení pufru mezi gelem a elektroforetickou vanou rozdílné a rovněž na přípravu gelu jsou použity dva různé pufry. Gel je tvořen horním úsekem (blíže ke startu migrace) tzv. „stacking“ gelem o nízké koncentraci akrylamidu a nízkém pH (6,8), v úseku dále od startu je tzv. separovací gel o vyšším pH (8,8) a vyšší koncentraci akrylamidu. „Stacking „ gel zabraňuje vysokomolekulární DNA, která je ve vzorku přítomná, aby hned na startu ucpala póry gelu a zabránila tak vstupu nízkomolekulárních molekul. Hlavní výhodou diskontinuálního systému nad kontinuálním systémem je to, že diskontinuální systém toleruje mnohem větší objemy vzorku.

Nanášecí pufry

Nanášecí pufry slouží ke snadnějšímu nanesení vzorku do jamek elektroforetického gelu a také kontrole rychlosti průběhu elektroforézy. Nanášecí pufr obsahuje bromfenolovou modř nebo barvivo xylen cyanol. Barvivo obarví testovaný roztok s DNA, což umožní lepší nanášení vzorku na gel a sledování vzorku při separaci. V průběhu elektroforetické separace barvivo migruje gelem. Nanášecí pufr také obsahuje glycerol, který způsobí usazení vzorku na dno jamky gelu. Někdy nanášecí pufr obsahuje i EDTA, která umožní zastavení případné enzymatické reakce. Rychlost migrace barviva v závislosti na koncentraci agarózy je uvedena v tabulce.

Koncentrace agarosy (%)	Xylen cyanol	Bromfenolová modř
0,5-1,5	4-5 kb	400-500 bp
2-3	750 bp	100 bp
4-5	125 bp	25 bp

Velikostní marker

Velikostní marker (hmotnostní standard, "ladder") slouží pro odhad velikosti separovaných fragmentů nukleových kyselin. Jedná se o soubor velikostně definovaných fragmentů. Nanáší se do jedné jamky v gelu paralelně k testovaným vzorkům. Jedná se většinou o plazmidovou DNA štěpenou několika restrikčními enzymy. Např. pro fragmenty s očekávanou velikostí 100 – 1000 bp používáme 100 bp ladder, pro fragmenty od 1 kb do 10 kb používáme 1 kb ladder. Dále jsou k dispozici 2-log laddery, které pokrývají rozsah 100 bp – 10 kb. Existují také laddery pro PFG elektroforézu, tedy velké fragmenty např. kvasinkové DNA. Při separaci RNA se místo DNA markeru používá RNA marker.

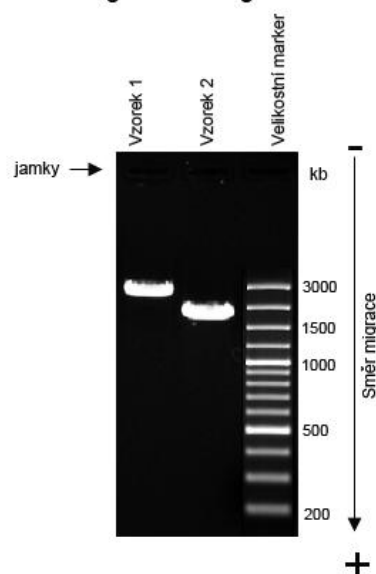
Způsoby vizualizace nukleových kyselin po elektroforetické separaci

Nejběžnějším způsobem vizualizace molekul nukleových kyselin po elektroforetické separaci je jejich obarvení fluorescenčními barvivy. Tradičně je k tomuto využíván etidium bromid (EtBr), v poslední době je to také GelRed či SYBR Green. Ve všech těchto případech se tyto látky navazují na nukleové kyseliny. Z toho plyne, že všechny tyto látky jsou potenciální mutageny a práce s nimi vyžaduje obezřetnost a striktní dodržování bezpečnosti práce.

Fluorescenční barvivo se přidává buď přímo do gelu při přípravě gelu, nebo se nukleové kyseliny barví až po ukončení elektroforézy, tak, že se gel na cca 10 minut ponoří do lázně s barvivem. Nukleové kyseliny jsou po obarvení fluorescenčními barvivy vizualizovány pod fluorescenční lampou.

Etidium bromid je k vizualizaci nukleových kyselin využíván nejčastěji. Udává se, že EtBr se vmezeřuje svou plochou molekulou mezi ploché páry bází v molekule DNA, případně v dvoujvláknových úsecích molekul RNA. Pomocí EtBr je možno po elektroforetické separaci vizualizovat množství DNA v jedné délce o minimálně 20 ng. V určitých případech je třeba brát v potaz, že vazba EtBr na nukleovou kyselinu může měnit její elektroforetickou mobilitu, navázáním etidium bromidu může být totiž ovlivněn náboj a konformace molekul.

ELFO v agarosovém gelu



Jinou možností vizualizace separovaných molekul je barvení stříbrem, konkrétně působením roztoku nitrátu stříbra či komplexem stříbro-amonium.

Vizualizace může být rovněž docílena hybridizací separovaných molekul se specifickými sondami metodou Southernovy hybridizace.