

Elektromigrační metody

Princip

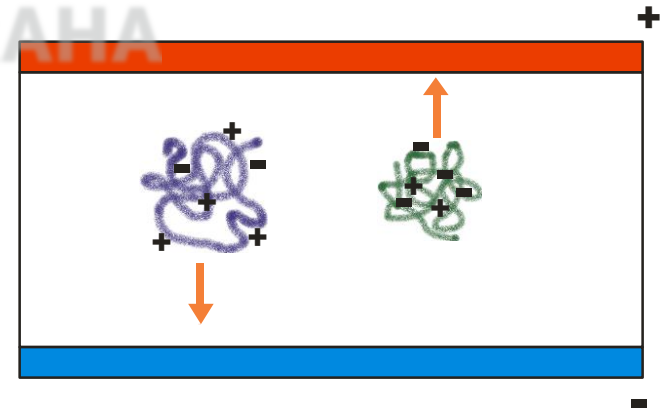
- metoda využívaná k separaci makromolekul na základě náboje, konformace nebo velikosti
- migrace nabité částice v elektrickém poli je úměrná jejímu celkovému náboji, velikosti a tvaru

$$v = q \cdot E / f$$

rychlost → v ← celkový náboj q ← intenzita el. pole E ← frikční koeficient f (popisuje tvar a velikost molekuly)

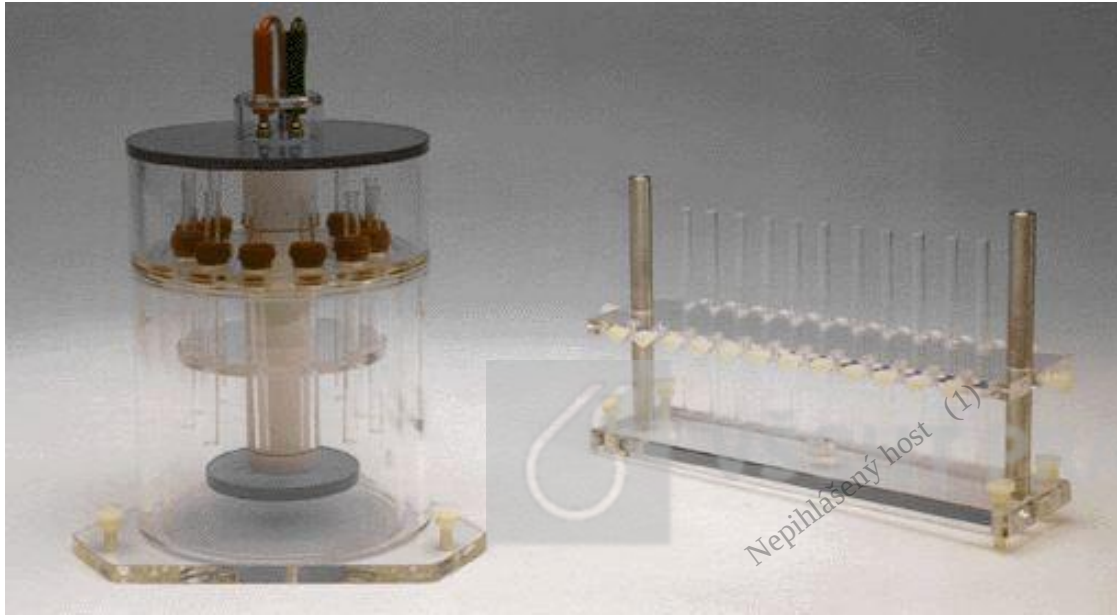
$pI > pH$ → kladný náboj
 $pI < pH$ → záporný náboj

- malé částice s velkým nábojem – velká pohyblivost
- velké částice s malým nábojem – malá pohyblivost



- volná elektroforesa
- zónová elektroforesa
- rovnovážná elektroforesa – isoelektrická fokusace
- kapilární elektroforesa

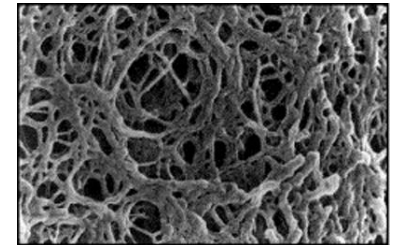
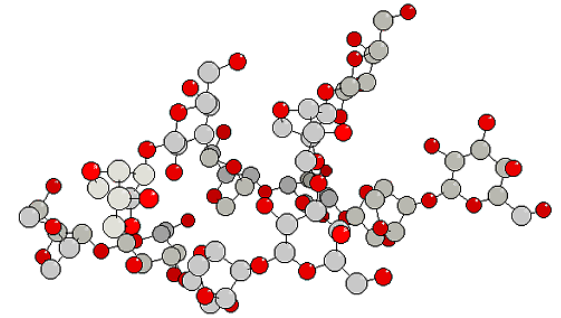
Aparatury pro trubičkové gely



Gely

AGAROSA

- polysacharid z červených mořských řas
- extrémně jednoduchá příprava
- pory větší než 10 nm
- teplota tání 35°C - 95°C – „low melting“ agarosa (teplota tání ~ 65°C)
- velikost pórů: 150 nm – 1 % gel
500 nm – 0,16 % gel
- koncentrační rozsah – 0,5 % - 4 % → fragmenty DNA 100 – 50 000 bp
- velmi velké proteiny a proteinové agregáty

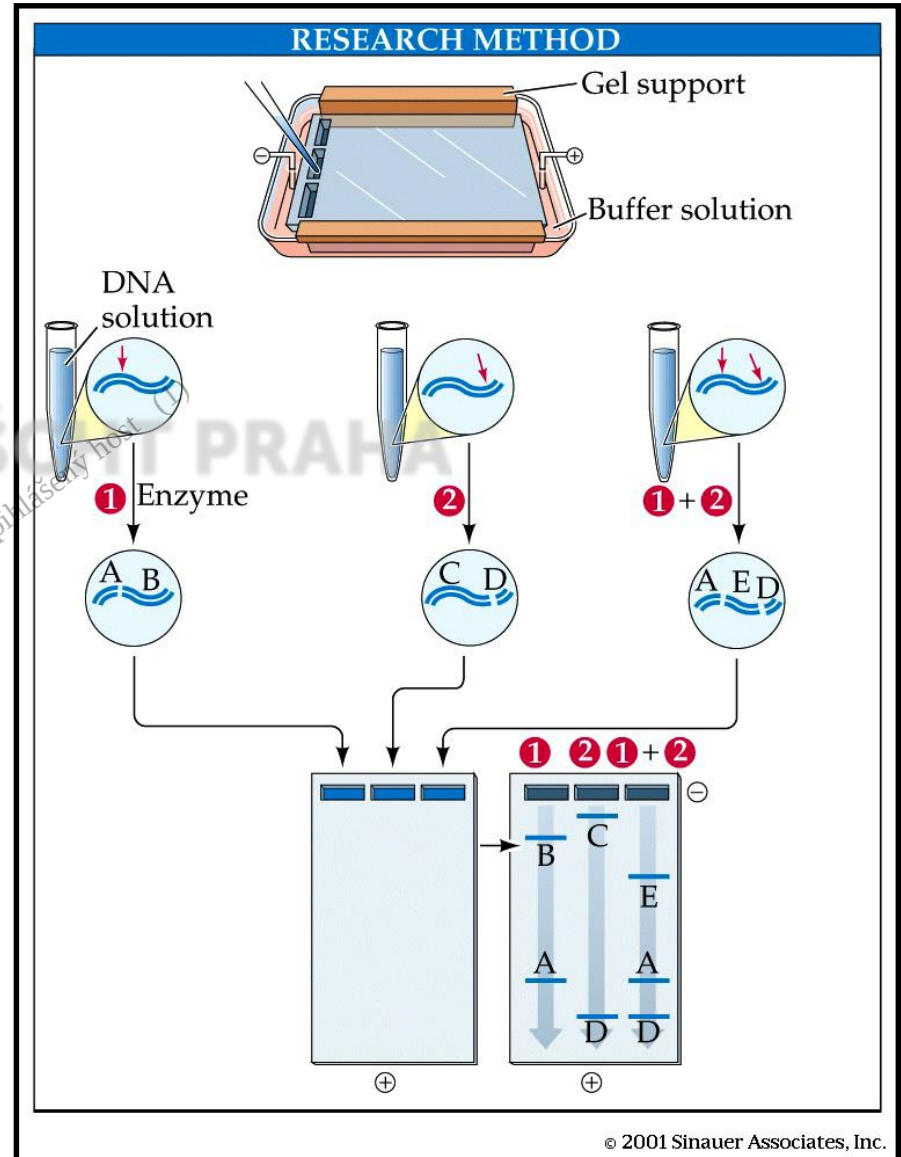
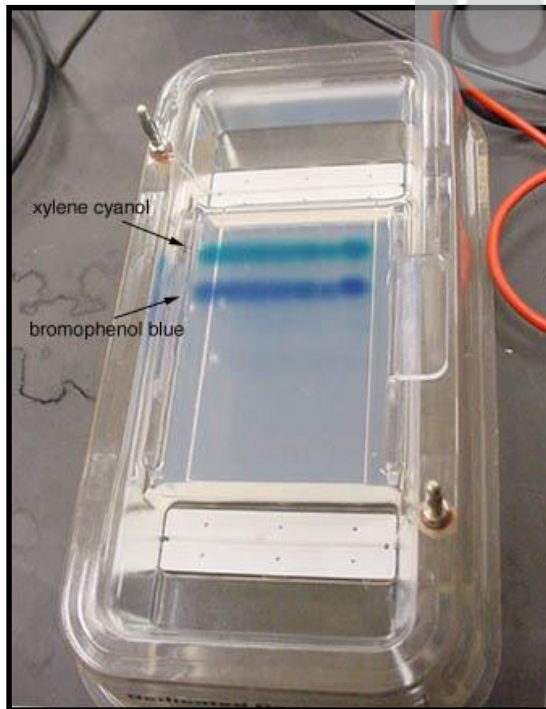


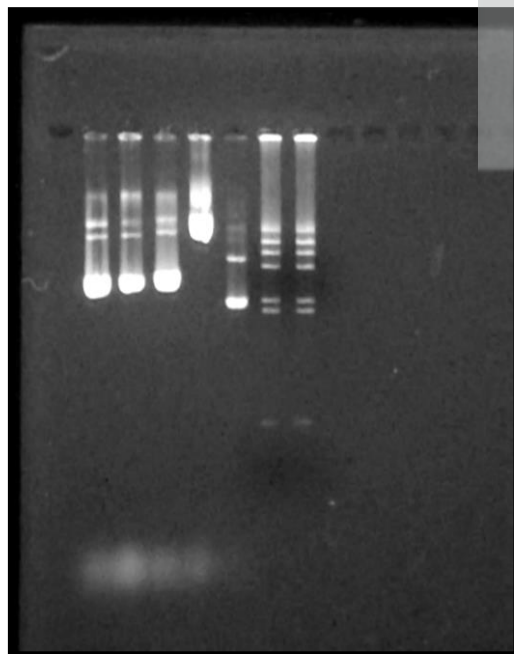
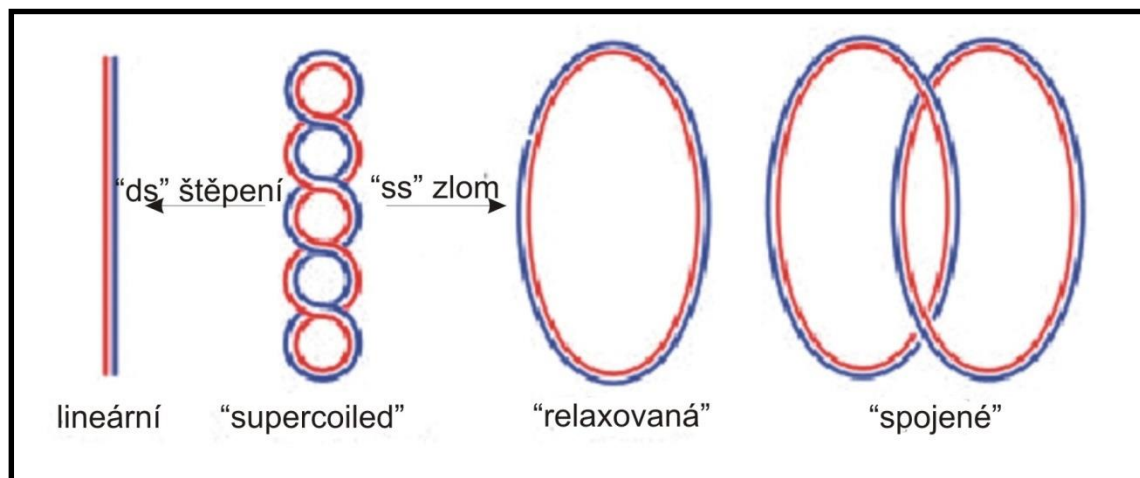
PUFR: Tris-acetát-EDTA (TAE) nebo Tris-borát-EDTA (TBE)

NANÁŠECÍ PUFR („loading buffer“-PLB): sacharosa, glycerol, ...
bromphenolová modř a xylen-cyanol

Nukleové kyseliny

- analýza a purifikace DNA
restričních fragmentů
- Ethidium bromid, SYBR Green
citlivost 100 pg – 1 ng/proužek

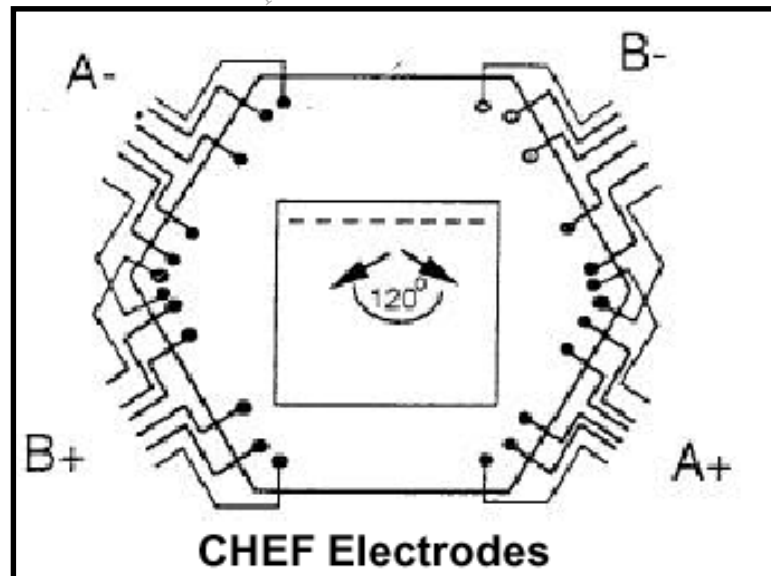
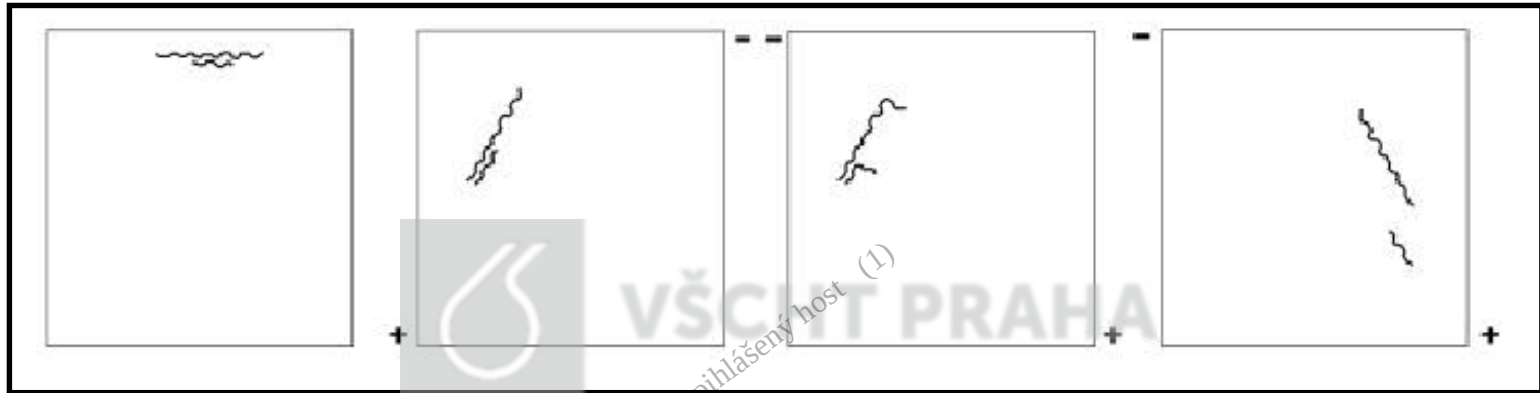




% agarosa	rozsah [kb]
0,7	0,8 - 20
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 4
2,0	0,1 - 3

Pulsní gelová elektroforesa (PFG)

použití: separace nukleových kyselin (20 000 až 12 000 000 bp)



Uspořádání PFG

gelová elektroforéza s inverzní polaritou (**FIGE**)

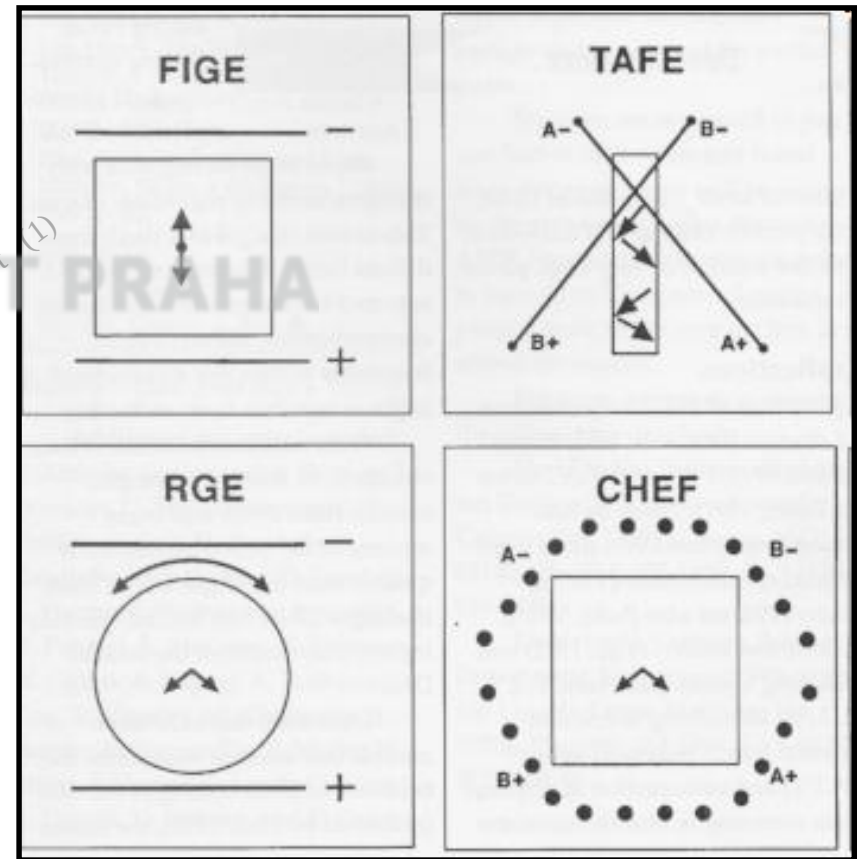
příčně střídavá elektroforéza (**TAFE**)

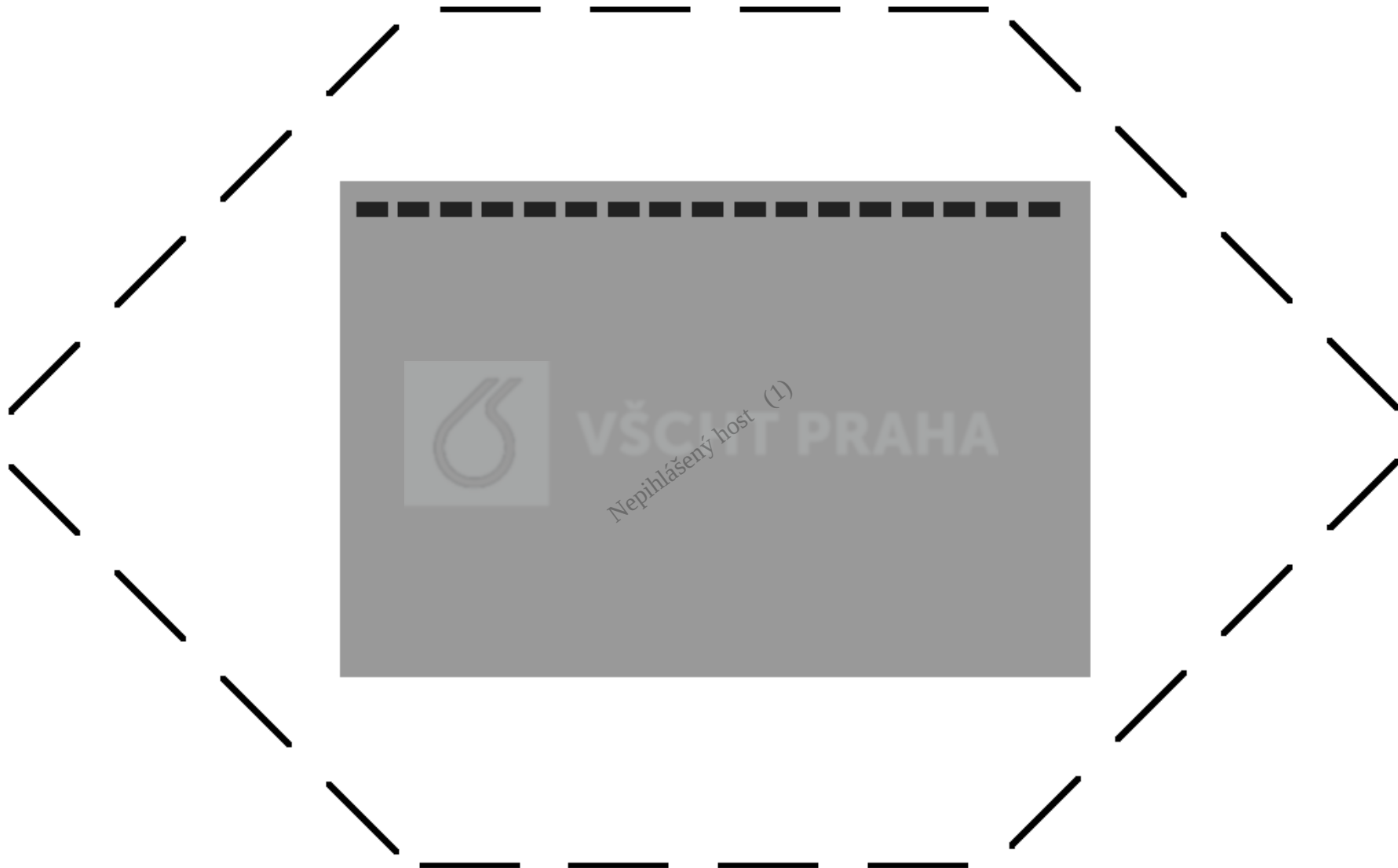
rotační gelová elektroforéza (**RGE**)

„upnuté“ (clamped) homogenní
elektrické pole (**CHEF**)



Nepřihlášený host (1)





FIGE

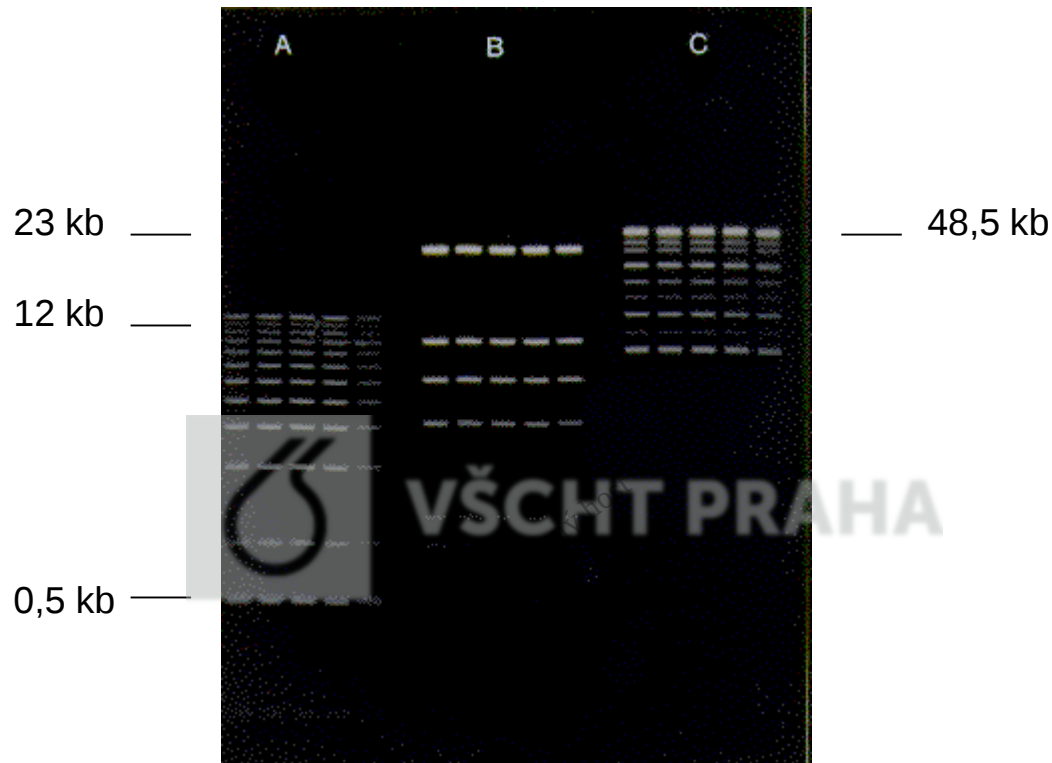


Figure 2. Increased separation of the 20-50 kb range with field inversion gel electrophoresis (FIGE). Run conditions: 230 V, 7.9 V/cm, **16 hrs., 50 msec.** pulse, forward:reverse pulse ratio = 2.5:1, 1% GTG agarose, 0.5X TBE, 10 C.a) 1 kb ladder, 0.5-12 kb; b) Lambda/Hind III, 0.5-23 kb; and c) High molecular weight markers, 8.3-48.5 kb.

RGE

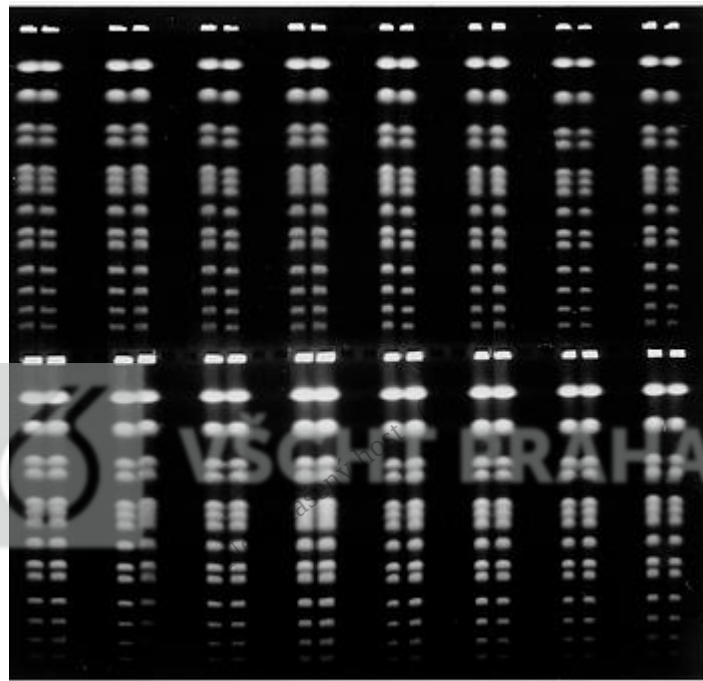


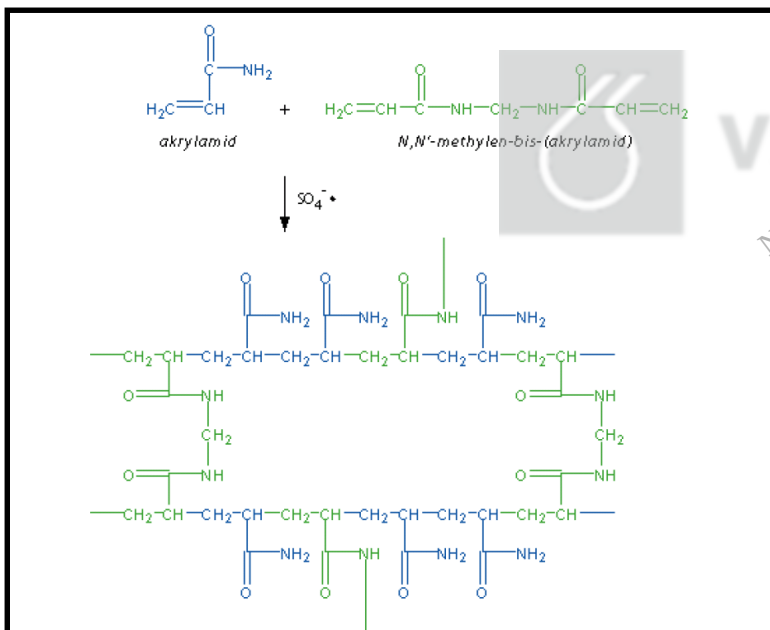
Figure 3. Rotating gel electrophoresis (RGE) separation *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes (**245-2190 kb**). Run conditions: 180 V, 5.1 V/cm, **34 hrs., 120 angle, 60-120 sec.** pulse ramp, 0.5X TBE, 1.2% GTG agarose, 10 C. Two combs were used on the same gel to load 32 samples, a maximum of 72 are possible

POLYAKRYLAMID

- chemicky inertní a mechanicky stabilní
- „obtížnější“ příprava oproti agarosovému gelu

T – celková koncentrace akrylamidu

C – stupeň prokřížení – podíl dimeru k monomeru



$$T = \frac{a + b}{V} \cdot 100[\%]$$

$$C = \frac{b}{a + b} \cdot 100[\%]$$

a...hmotnost akrylamidu [g]

b...hmotnost methylenbisakrylamidu [g]

V...objem [ml]

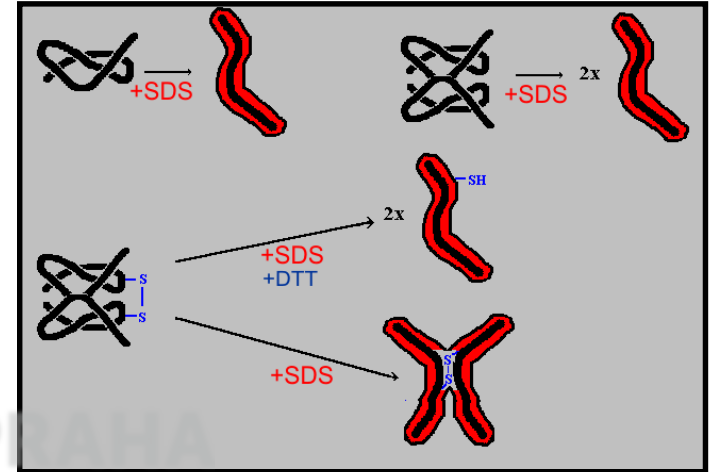
když *C* je konstantní a *T* roste, zmenšuje se velikost pórů

když *T* je konstantní a *C* roste, velikost pórů se parabolicky mění, při vysokých a nízkých hodnotách *C* jsou póry největší

SDS-PAGE

Tris/Gly/SDS

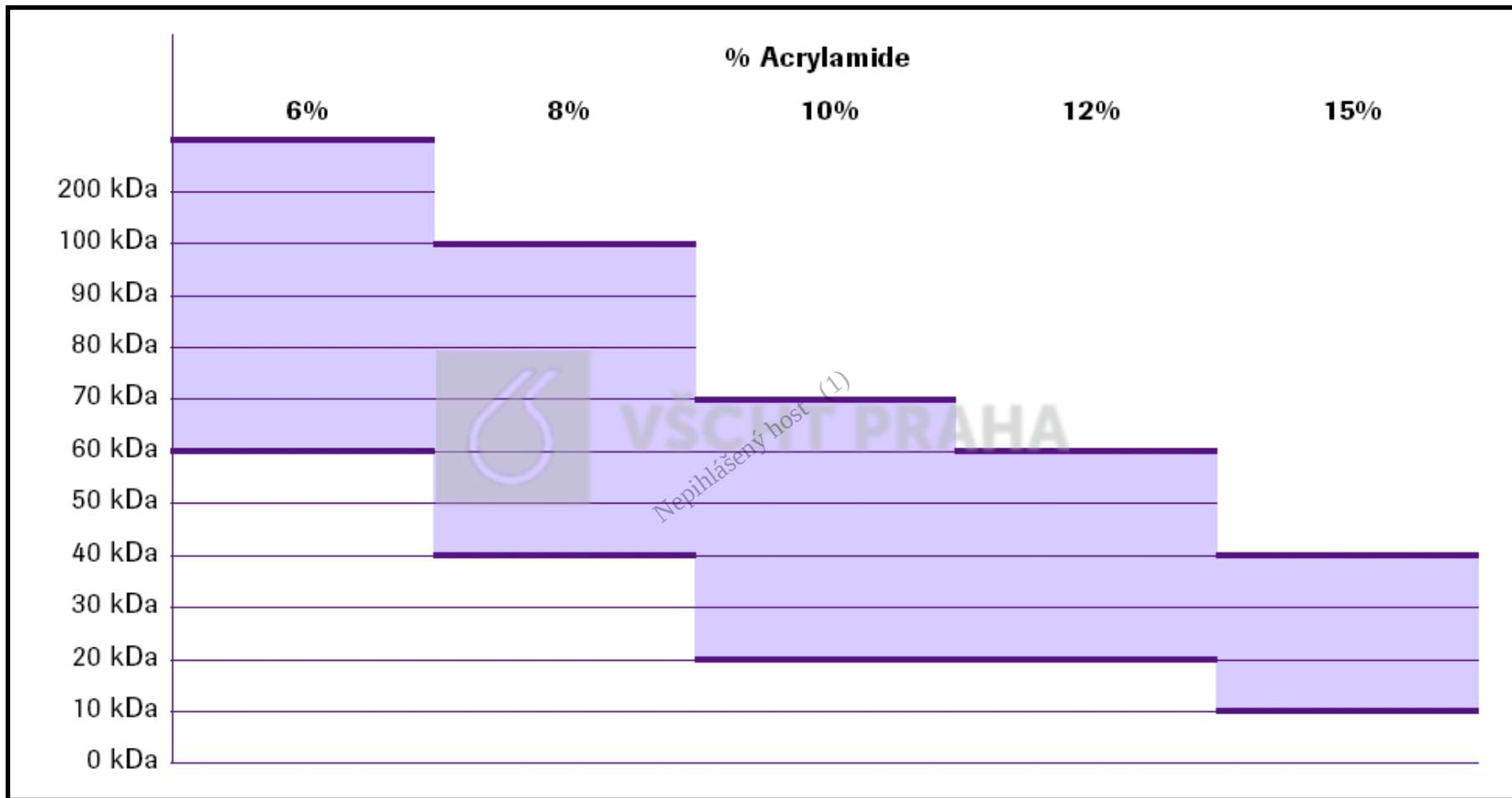
- anionický detergent
- po zahřátí na 100 °C rozbaluje protein a váže se na něj (1 molekula SDS na 2 AK, 1,4 g SDS na 1 g proteinu)
- velký náboj → velká pohyblivost
- vysoké rozlišení
- dobrá fixace proužků
- lze odstranit z gelu, aniž by se uvolnily proteiny
- 10x vyšší detekční limit než nativní elektroforéza

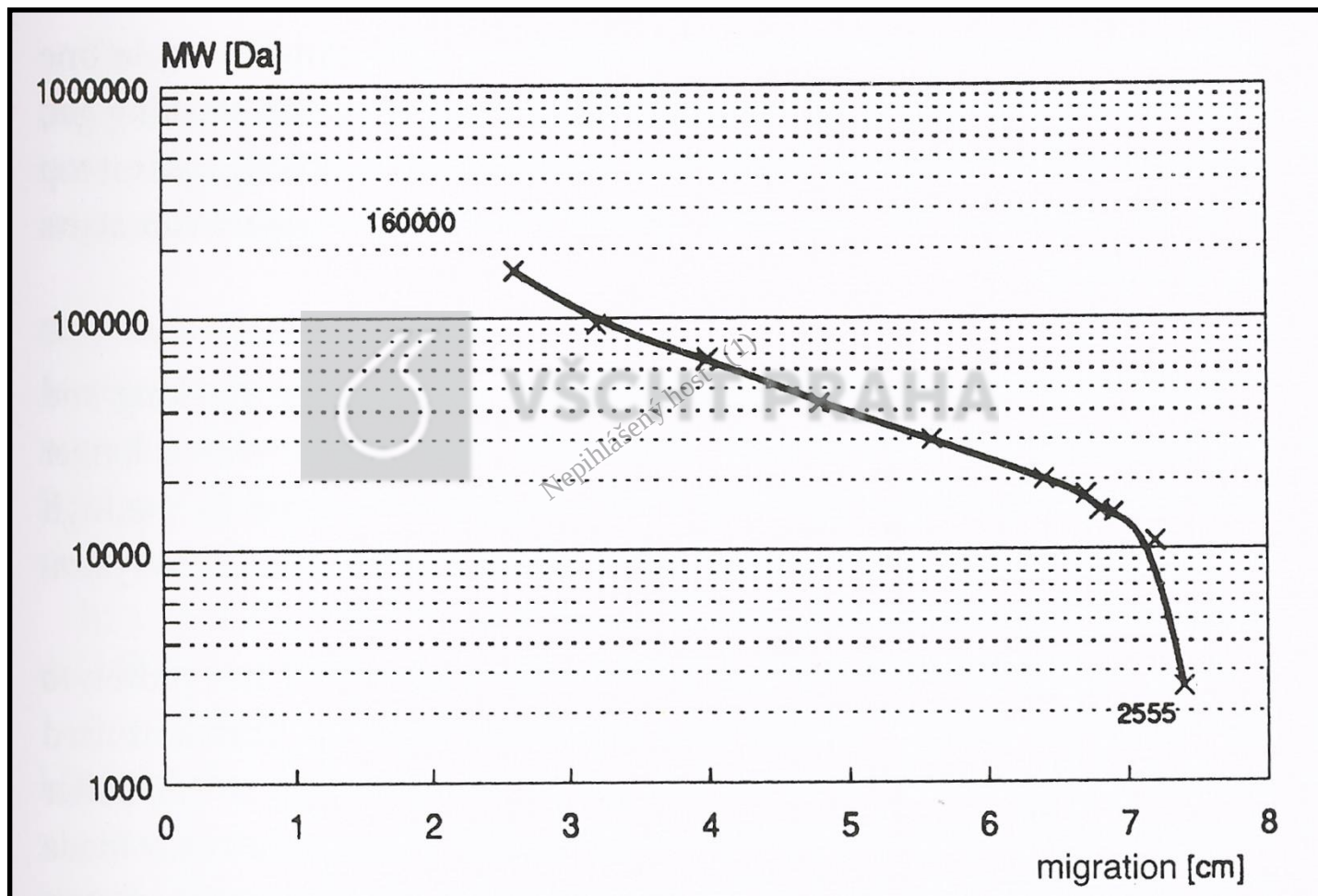


Nevýhody:

- za nízkých teplot krystalizuje
- mnoho proteinů se chová anomálně
 - v důsledku neuniformní vazby SDS
 - proteiny s velkým záporným, velkým kladným nábojem a na prolin bohaté proteiny

NANÁŠECÍ PUFR („loading buffer“-PLB): SDS, glycerol, DTT, pufr, bromfenolová modř, H₂O





Dělicí gel	V[ml]
H ₂ O	1,9
30% acrylamide mix*	1,7
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,3
10% SDS	0,05
10% APS	0,05
TEMED	0,002

$$T = \frac{a+b}{V} \cdot 100[\%]$$

$$C = \frac{b}{a+b} \cdot 100[\%]$$

Zaostřovací gel	V[ml]
H ₂ O	0,68
30% acrylamide mix*	0,17
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	0,13
10% SDS	0,01
10% APS	0,01
TEMED	0,001

?

* akrylamid:bisakrylamid – 29:1

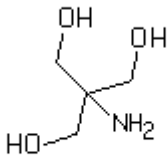
PAGE

Uspořádání: kontinuální
 diskontinuální

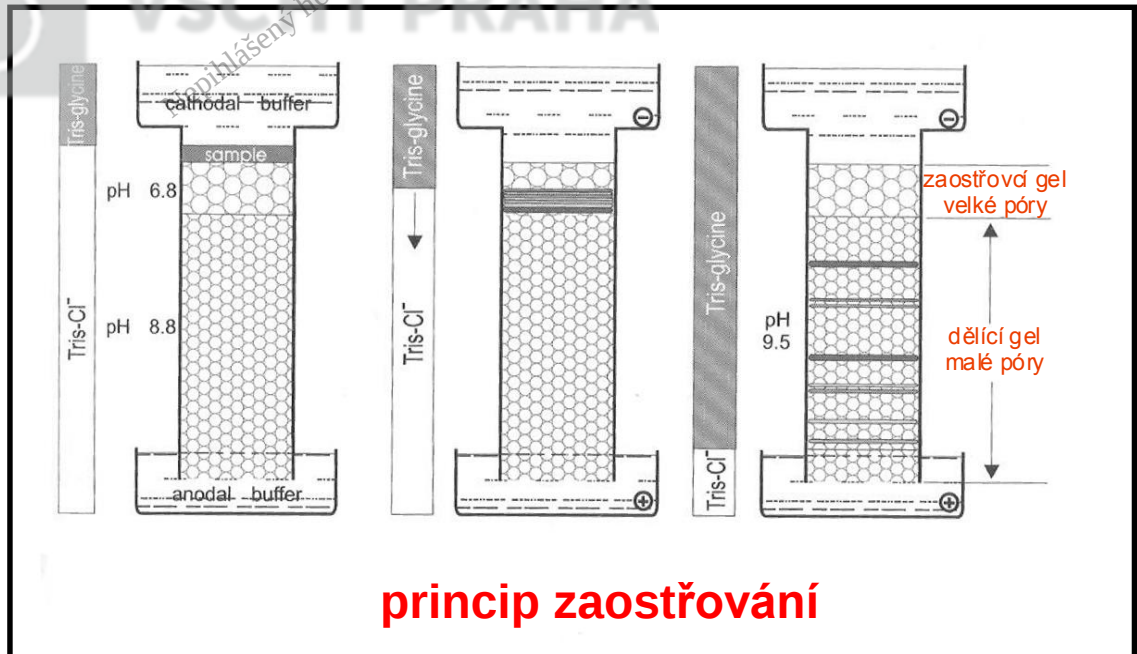
ZAOSTŘOVACÍ GEL: nižší hodnota pH, nižší koncentrace polyakrylamidu

DĚLÍCÍ GEL: má vyšší hodnotu pH než rozdělovací

ELEKTRODOVÝ PUFER:
Tris/Glycin/SDS



Tris = tris(hydroxymethyl)amino methane



Yew Phew See
Peter M. Olley
George Jackowski

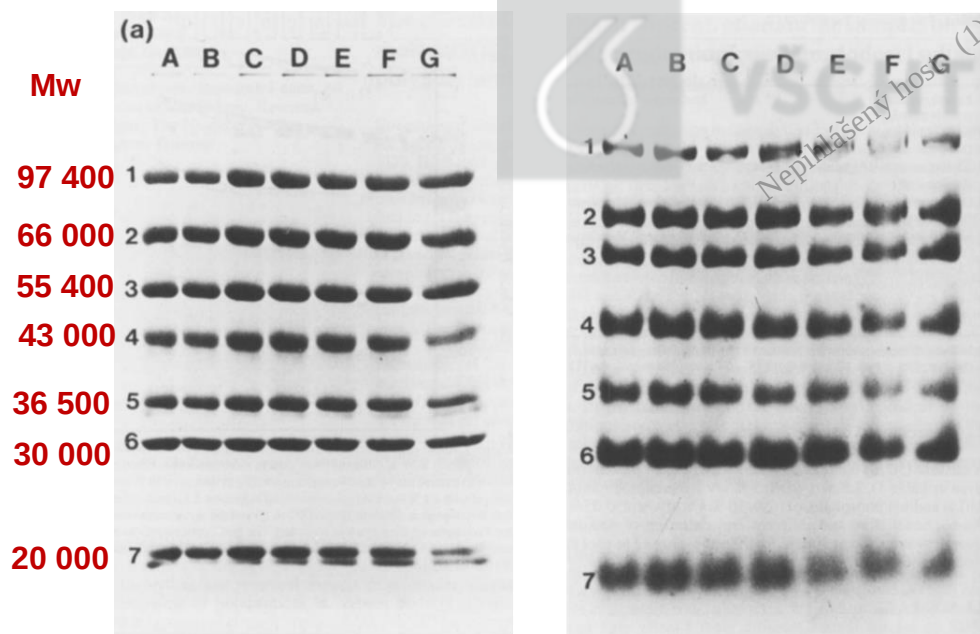
Cardiovascular Research Focus,
Division of Cardiology, Research
Institute, The Hospital for Sick
Children, Toronto

The effects of high salt concentrations in the samples on molecular weight determination in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

For proper molecular weight determination in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the protein should bind the same amount of SDS. High ionic strength had previously been shown to reduce the amount of SDS

Diskontinuální elfo

Kontinuální elfo



Vliv solí

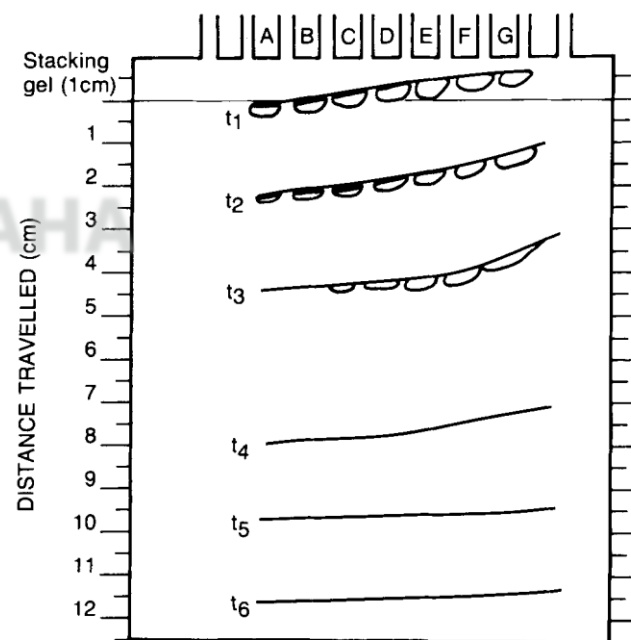


Figure 1. Effect of NaCl concentrations in the samples on the mobility of Bromophenol Blue at different times during electrophoresis. Electrophoresis was carried out by the discontinuous buffer system on a 10 % separation gel with a 4 % stacking gel as described in Section 2.3. Electrophoresis was interrupted at different times (t_{ZC} to t_6) and the distance travelled by the Bromophenol Blue dye was recorded. The NaCl concentrations in the samples are: (A) No NaCl; (B) 0.1 M; (C) 0.2 M; (D) 0.4 M; (E) 0.6 M; (F) 0.8 M; (G) 1.0 M.

Na co dávat pozor....



- správná koncentrace APS a TEMEDu
- vždy čerstvý APS ???
- odvzdušnění akrylamidu urychlí polymerizaci
- skla, „spacery“ i hřebínek otřít MetOH nebo EtOH
- zaostřovací gel aspoň 1 cm
- po přidání PLB k vzorku promíchat (vortex), po povaření znovu – lepší rozlišení
- před nanášením vzorku krátce stočit
- nízká koncentrace solí
- připravené (povařené) vzorky mohou být skladovány při -20 °C 3-4 týdny nebo ve 4 °C týden.
- opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte vzorky
- před použitím by skladované vzorky měly být ohřáty na 37 °C, aby se rozpustilo vysrážené SDS

Gel během polymerace praská

- ujistěte se, že se gel nezahřívá

Vzorek neklesá na dno jamky

- ujistěte se, že v PLB je glycerol
- hřeben byl odstraněn ještě před dopolymerováním

Deformované jamky

- neopatrně vyndán hřeben
- hřeben byl odstraněn ještě před dopolymerováním – bezprostředně po vyjmutí hřebenu jamky propláchnout

Vzorek po smíchání s PLB žlutý

- nízké pH - přidejte NaOH
- málo bromfenolové modře ve vzorkovém pufru

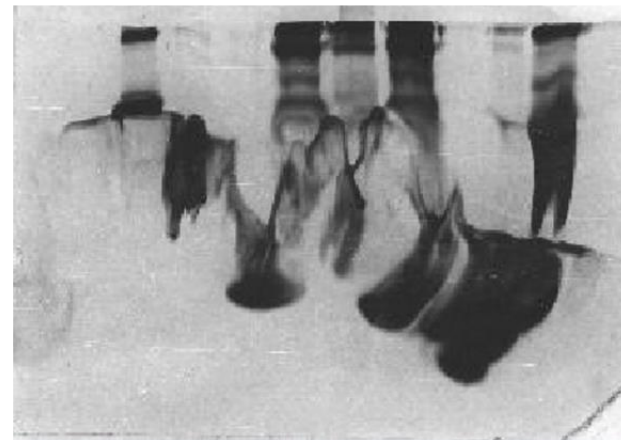
„Dvojbandy“

- připravit čerstvý vzorek
- ověřit si koncentraci DTT nebo β -merkaptoethanolu



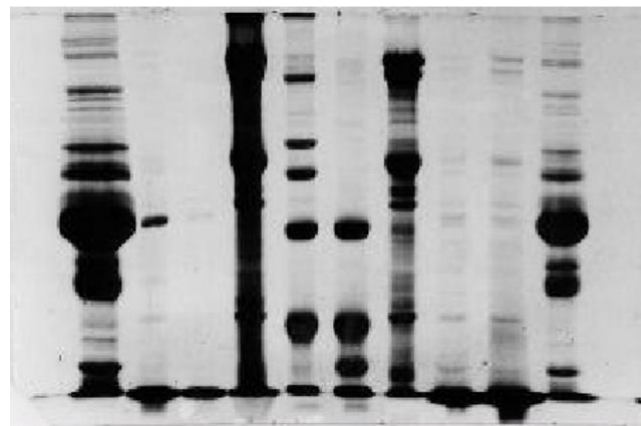
Chyby při přípravě gelu

- velké časové prodlevy při nalívání gelu
- nerovnoměrné póry v gelu
- horní část gelu polymerizovala rychleji než spodní



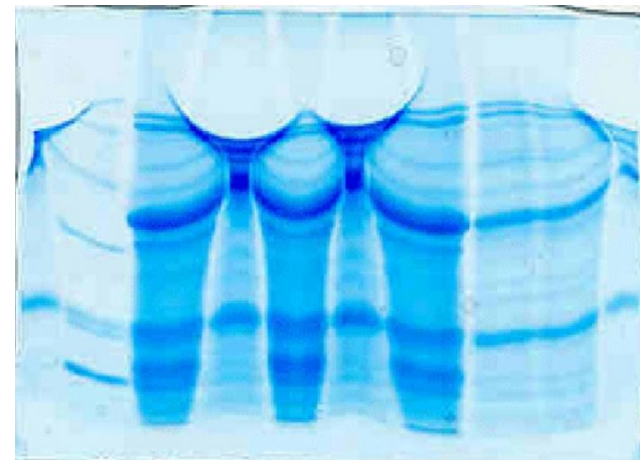
Intenzivní pozadí v dráze

- proteiny precipitující během elektroforézy
- precipitovaný protein se během elektroforézy postupně rozpouští
- velký objem vzorku



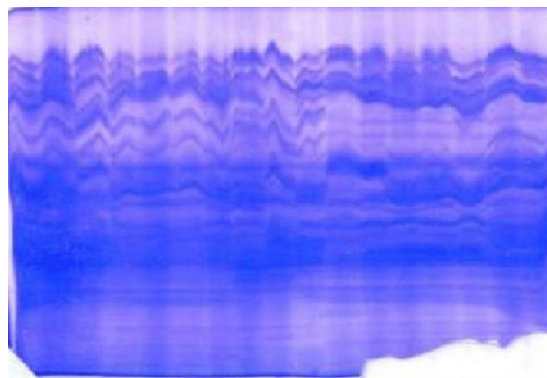
Vzorek difunduje z jamek

malé proteiny difundují rychleji než velké, pokud proteiny ve vzorku difundují do stran, mohou měnit elektrické pole působící na přilehlé dráhy, zejména pokud vzorky v sousedních jamkách obsahují převážně molekuly s vyšší molekulovou hmotností



- minimalizovat čas mezi nanesením vzorku a spuštěním elektroforézy
- nerozpustný materiál v gelu nebo neuniformní velikost pórů – přefiltrovat a dobře promíchat gel

- příliš vysoký proud - přehřátí

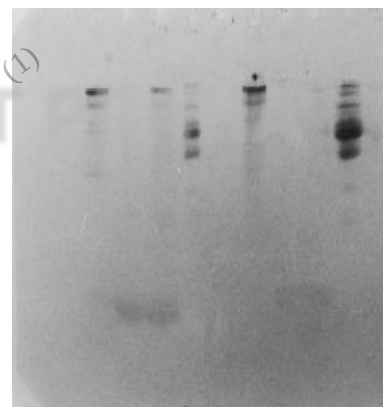


Slabě obarvený gel

- špatná fixace gelu po elektroforéze

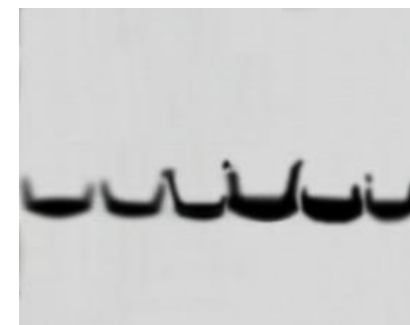


všcht
Nepřihlášený host (1)



Proužky ve tvaru ☺

- příliš rychlý průběh elektroforwy

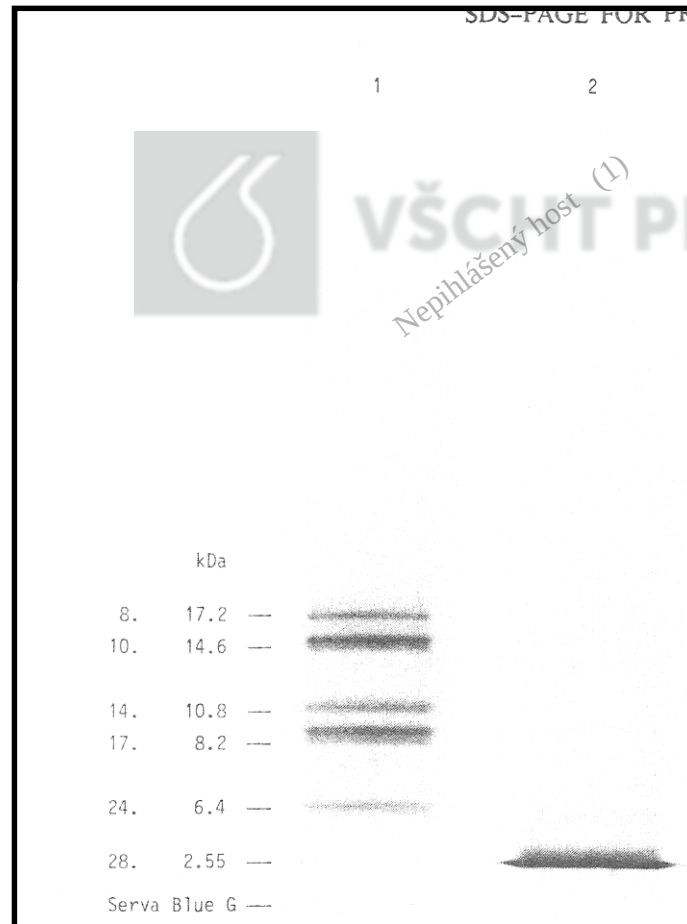
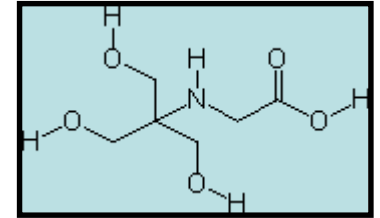


SDS-PAGE

Tris/Tricin/SDS

separace proteinů < 14 kDa → lineární rozlišení 1-100 kDa

Tricin = N-Tris(hydroxymethyl) methyl glycine



SDS-PAGE

Tris/Borát/EDTA

elektroforesa glykoproteinů → SDS se neváže na sacharidy

CTAB-PAGE

CTAB

- kationický detergent
- pro záporně nabité proteiny, silně bazické nukleoproteiny
- nedenaturuje protein, tj. řada proteinů má i po CTAB PAGE enzymatickou aktivitu
- kyselé prostředí – pH 3-5

Nativní-PAGE

- i jiné pufrы HEPES, MOPS, MES
- zymogramy

Fergusonova analýza

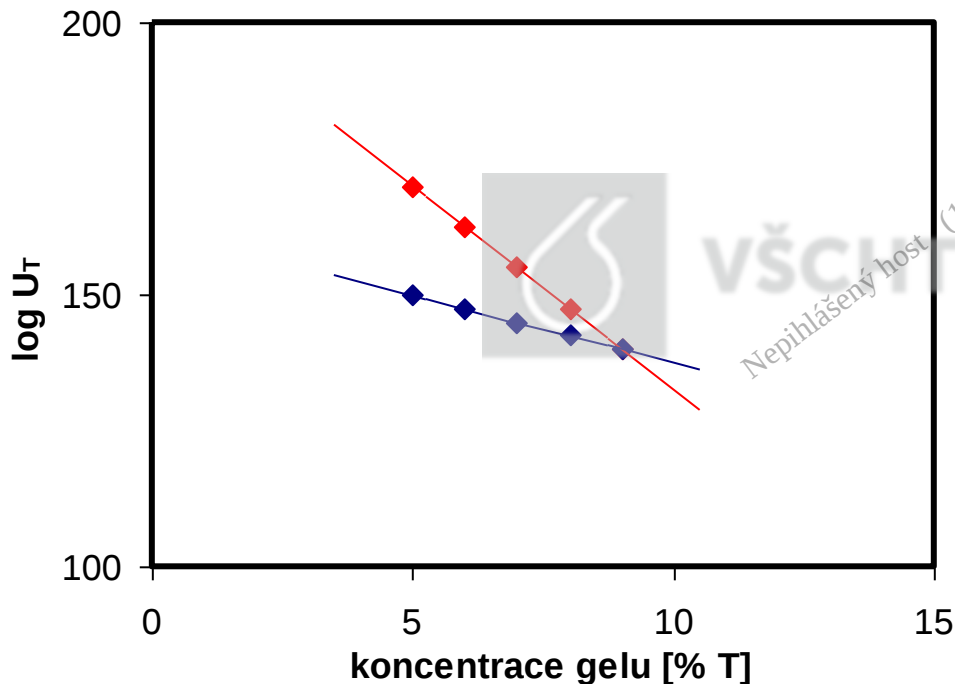
$$\log U_T = \log U_0 - K_R \cdot T$$

U_T ...relativní pohyblivost

U_0 ...volná relativní pohyblivost

K_R ...tzv. retardační koeficient

$$K_R = 2,43 \cdot 10^{-2} + 5,53 \cdot 10^{-7} \cdot M_r$$

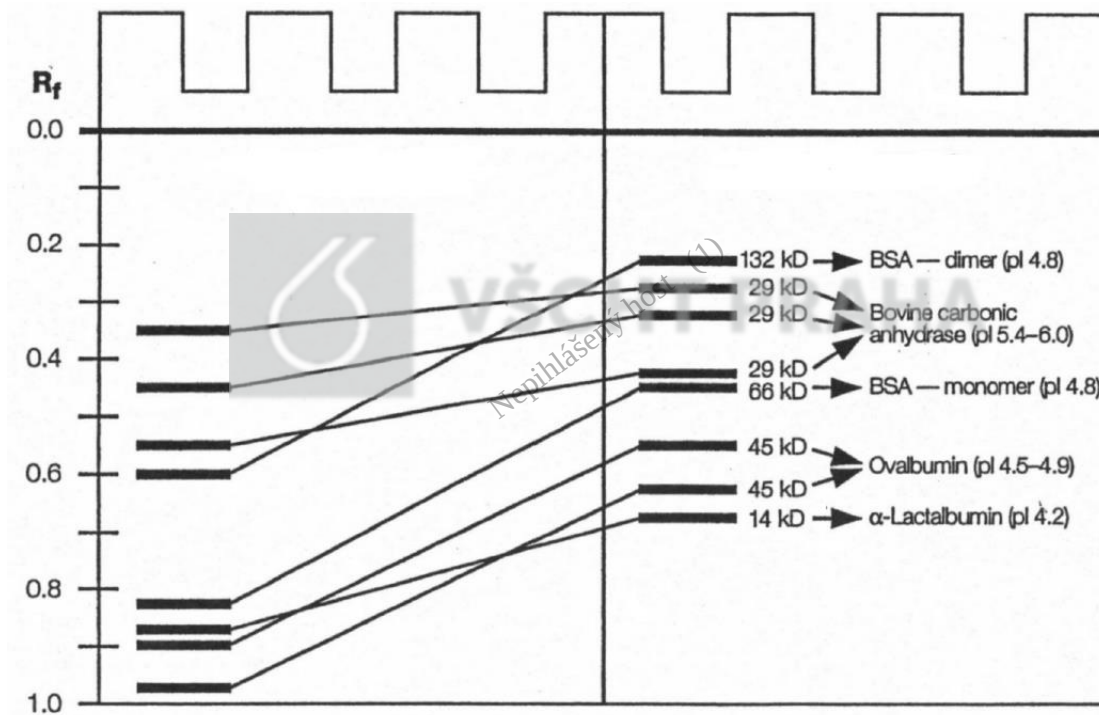


Ferguson, K.A. (1964) Starch-gel electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism* **13**, 985–1002

Vliv koncentrace akrylamidu na dělení při nativní PAGE

4% T, 2,67% C

8% T, 2,67% C



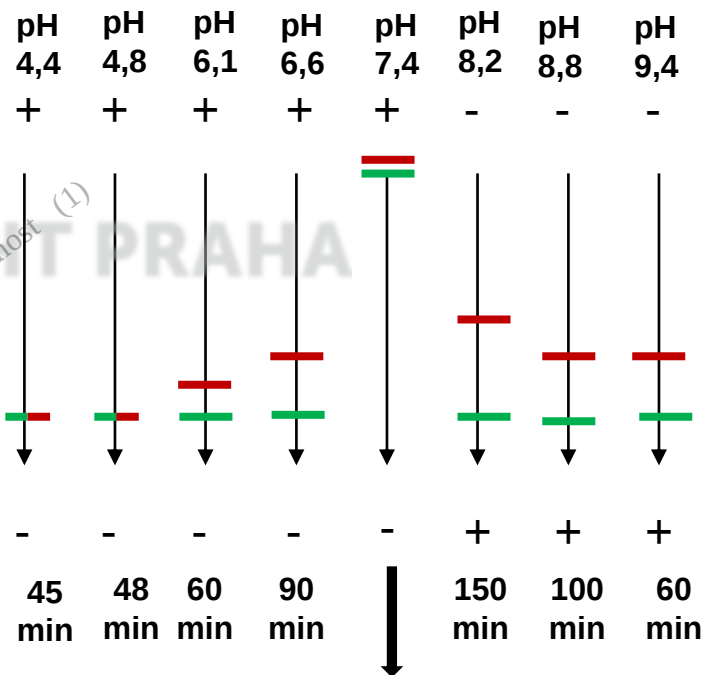
Pufry pro nativní PAGE

Vliv pH na mobilitu

pH ^b	Buffer	Basic component	Acidic component
3.8		β-Alanine 1X = 30 mM	Lactic acid 1X = 20 mM
4.4		β-Alanine 1X = 80 mM	Acetic acid 1X = 40 mM
4.8		Gaba 1X = 80 mM	Acetic acid 1X = 20 mM
6.1		Histidine 1X = 30 mM	Mes 1X = 30 mM
6.6		Histidine 1X = 25 mM	Mops 1X = 30 mM
7.4		Imidazole 1X = 43 mM	Hepes 1X = 35 mM
8.1		Tris 1X = 32 mM	Epps 1X = 30 mM
8.7		Tris 1X = 50 mM	Boric acid 1X = 25 mM
9.4		Tris 1X = 60 mM	Caps 1X = 40 mM
10.2		Ammonia 1X = 37 mM	Caps 1X = 20 mM

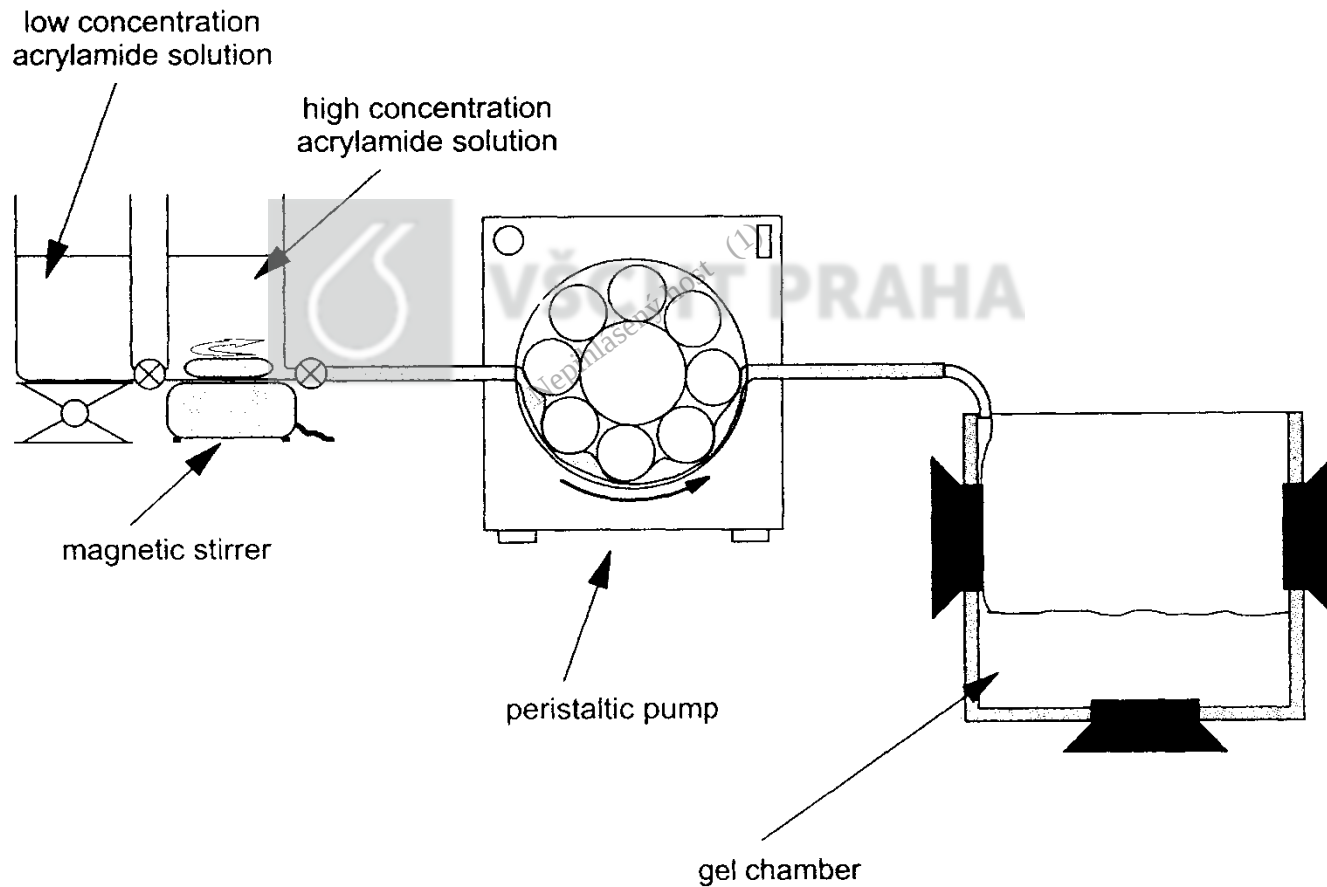
Hemoglobin A (pI 7,1) —

Hemoglobin C (pI 7,4) —

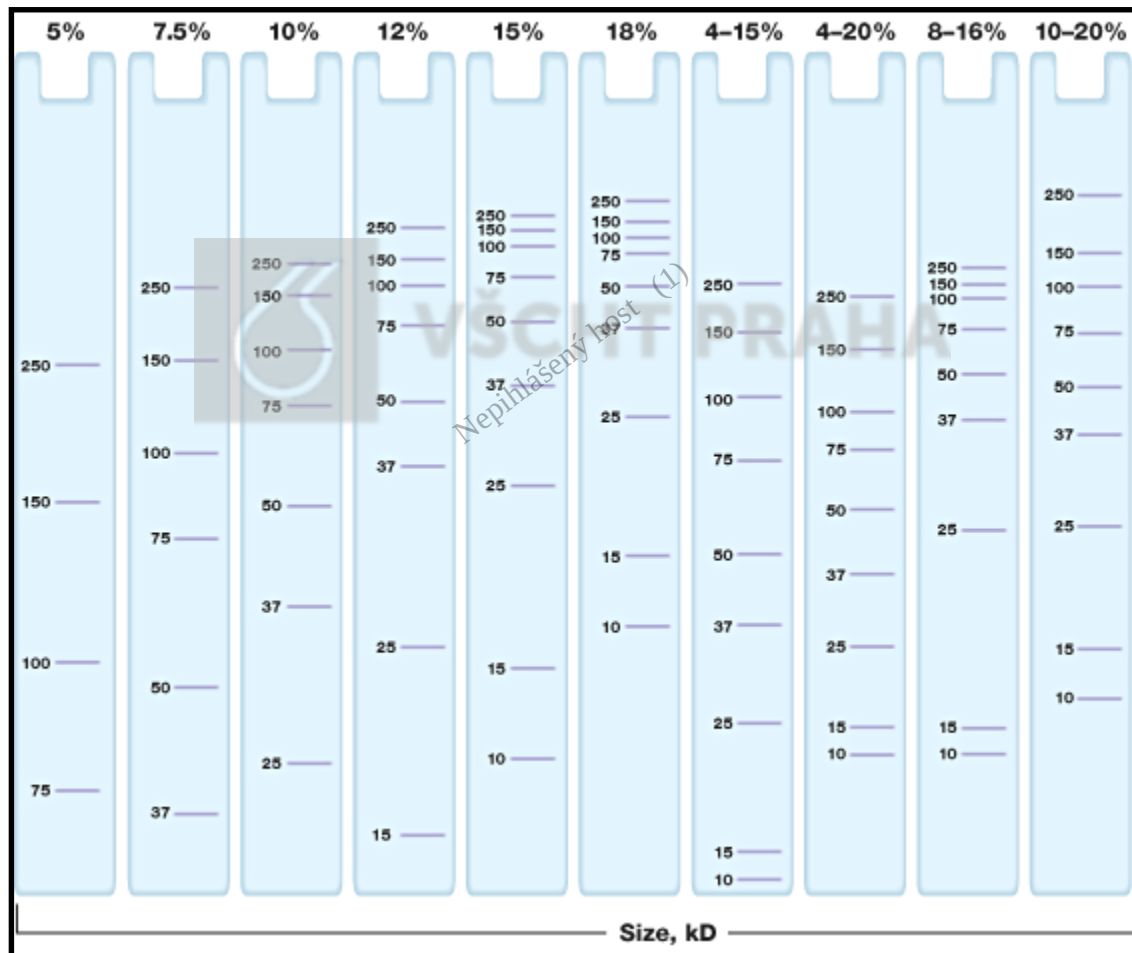


proteiny
nezaputují
do gelu

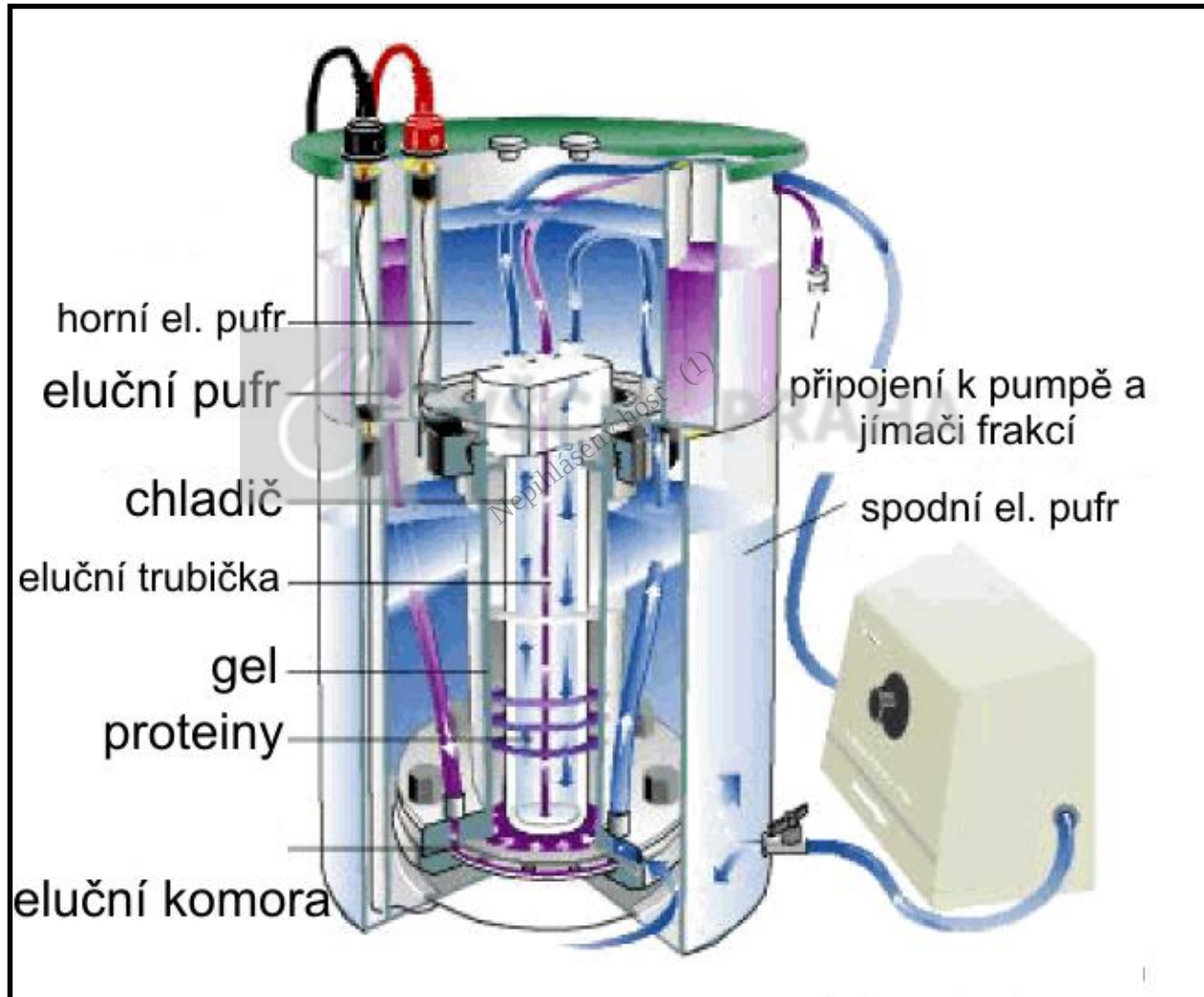
Gradientová gelová elektroforesa



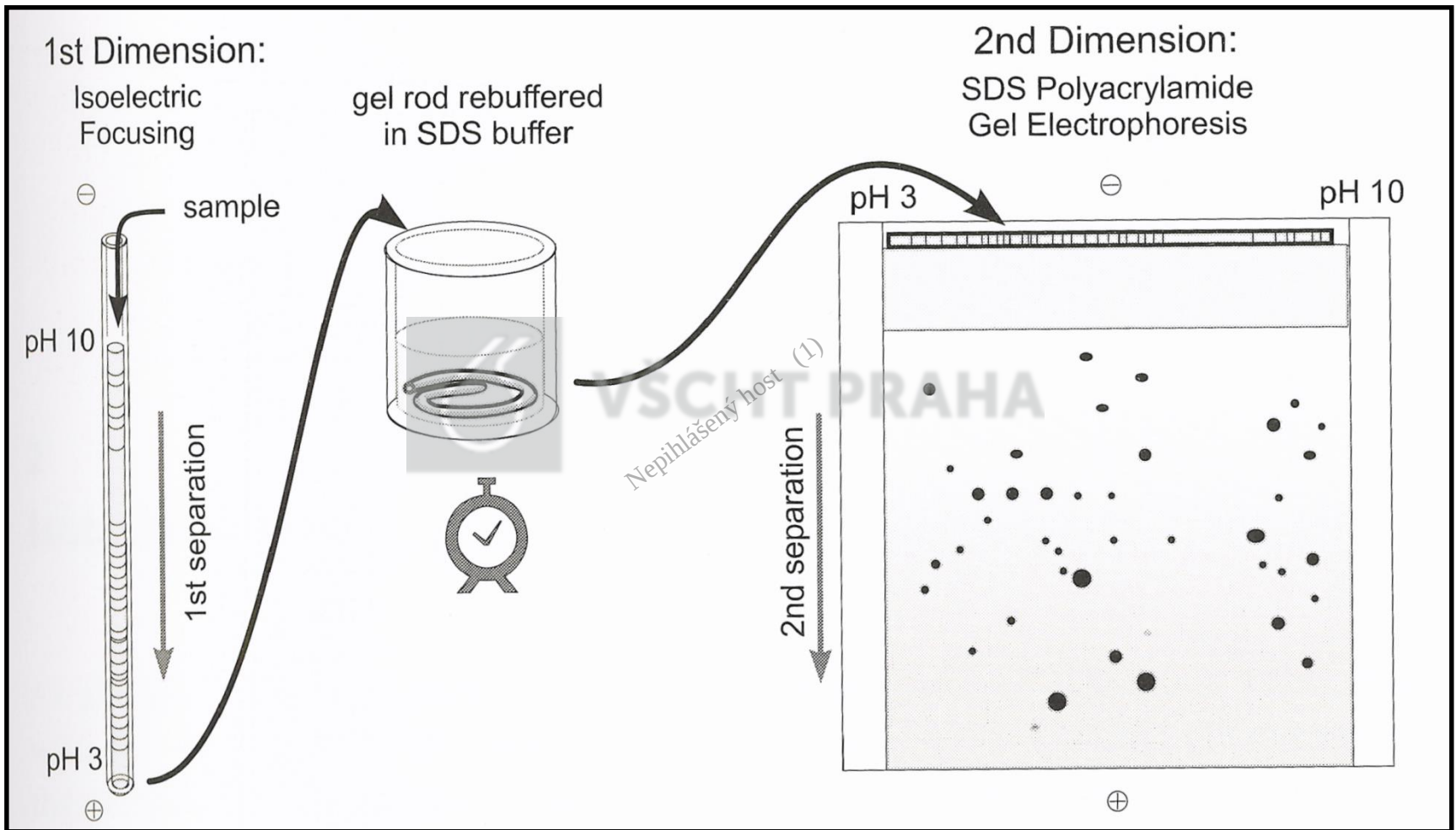
Gradientová gelová elektroforesa



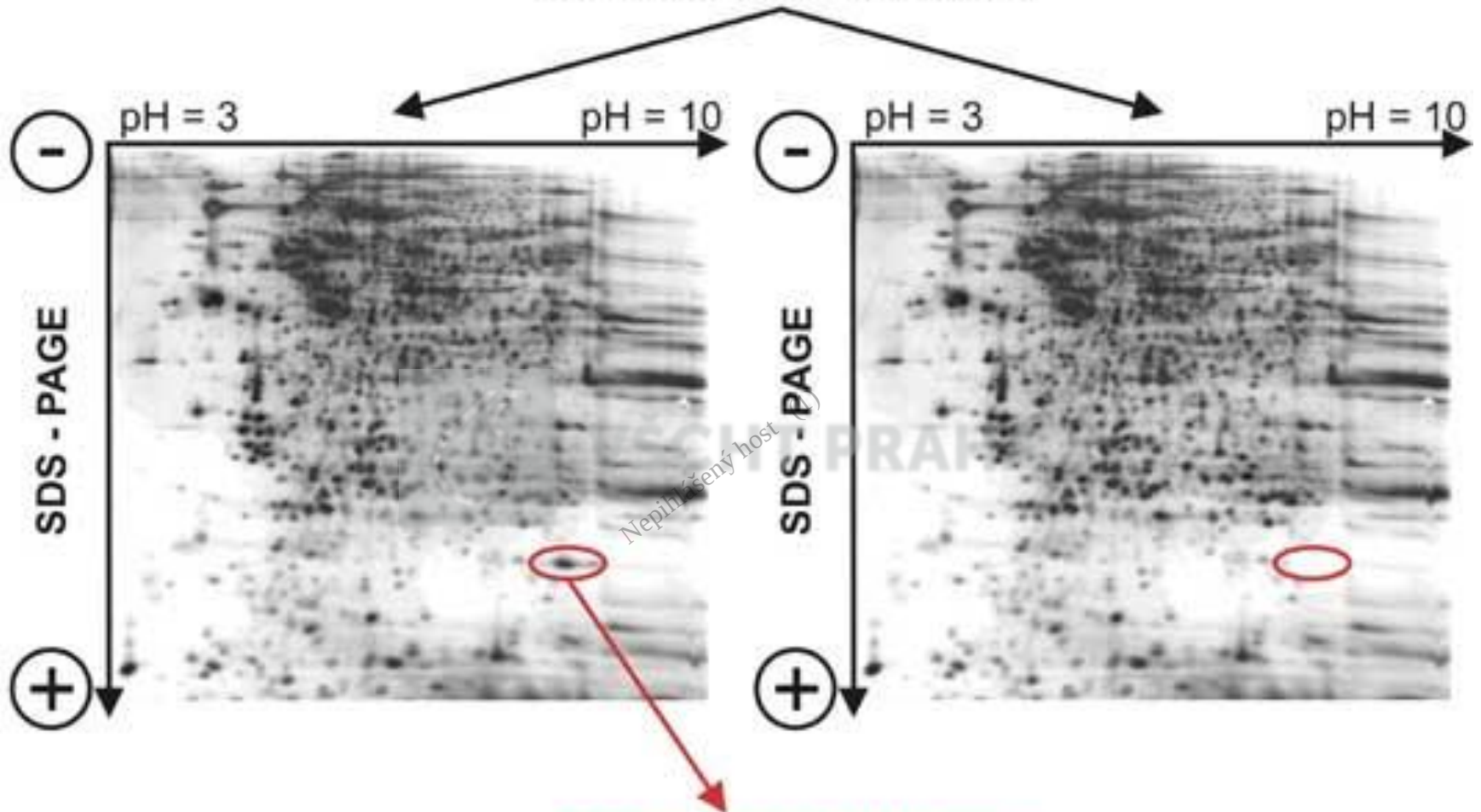
Preparativní PAGE



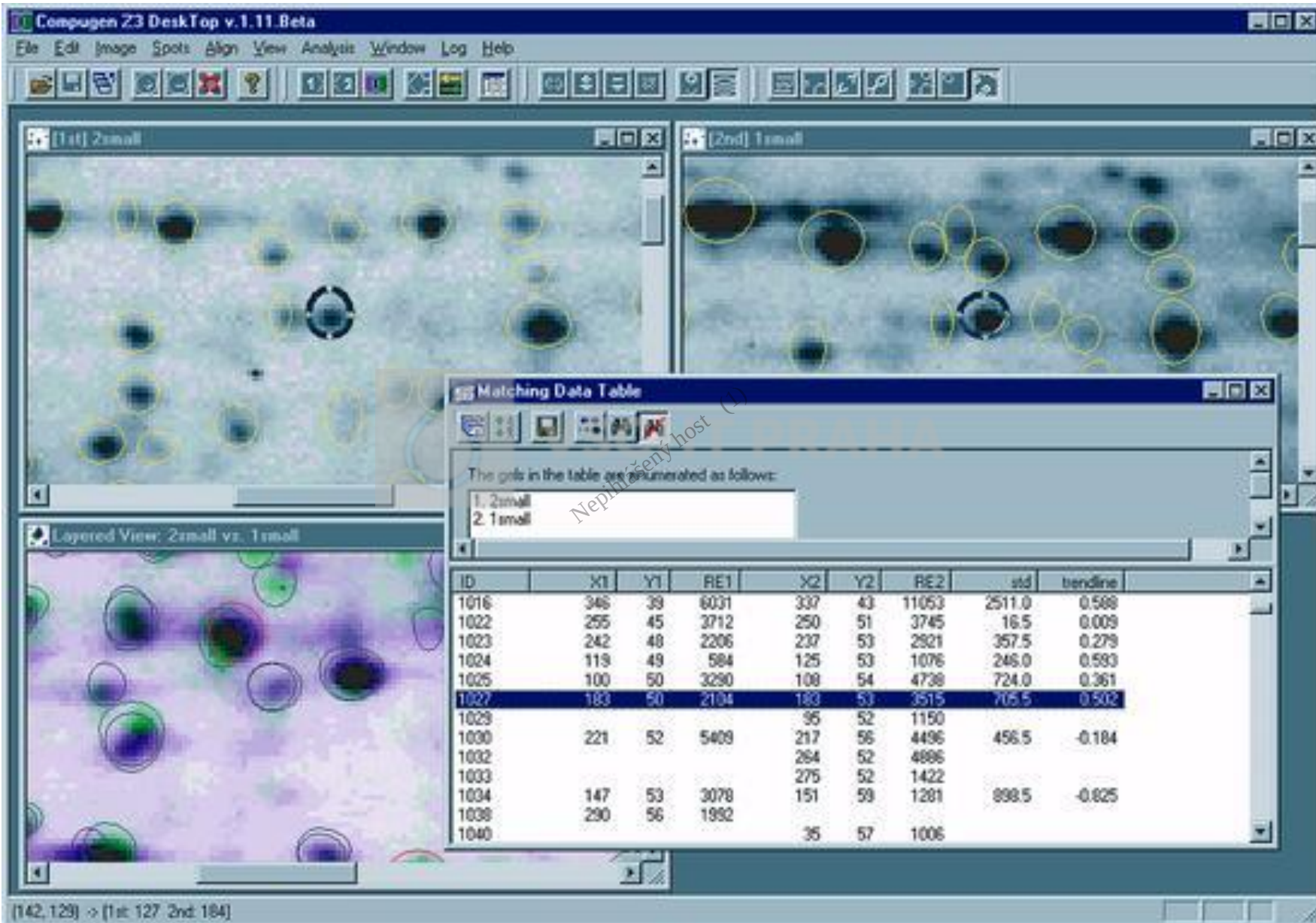
2D-PAGE



ISOELECTRIC FOCUSING



MASS SPECTROMETRY



PAGE nukleových kyselin fragmentů DNA

% akrylamid	rozsah [bp]
3,5	100 -1000
5,0	80 -500
8,0	60 - 400
12,0	40 - 200
20,0	10 - 100

ARDRA – restrikční analýza amplifikované rDNA

rozdělení po restrikčním štěpení → specifický obraz

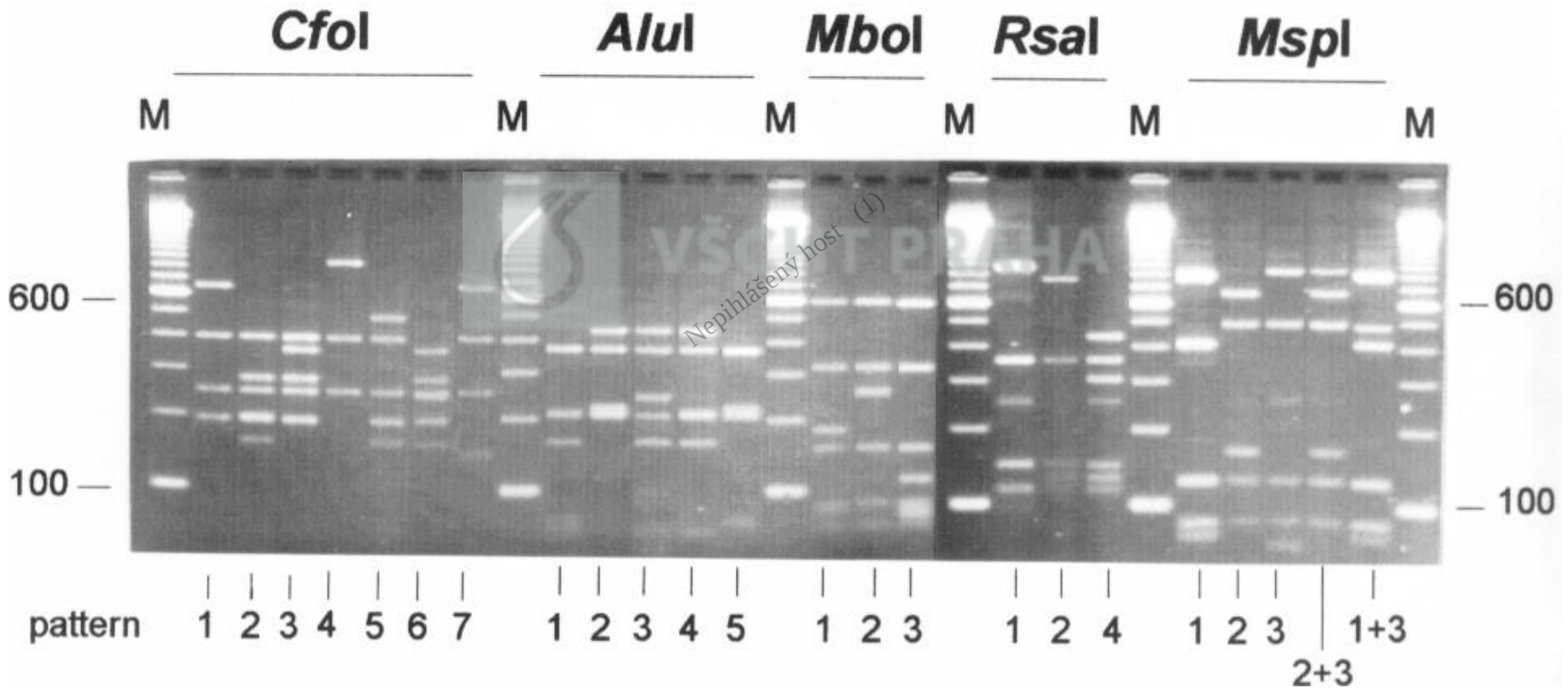
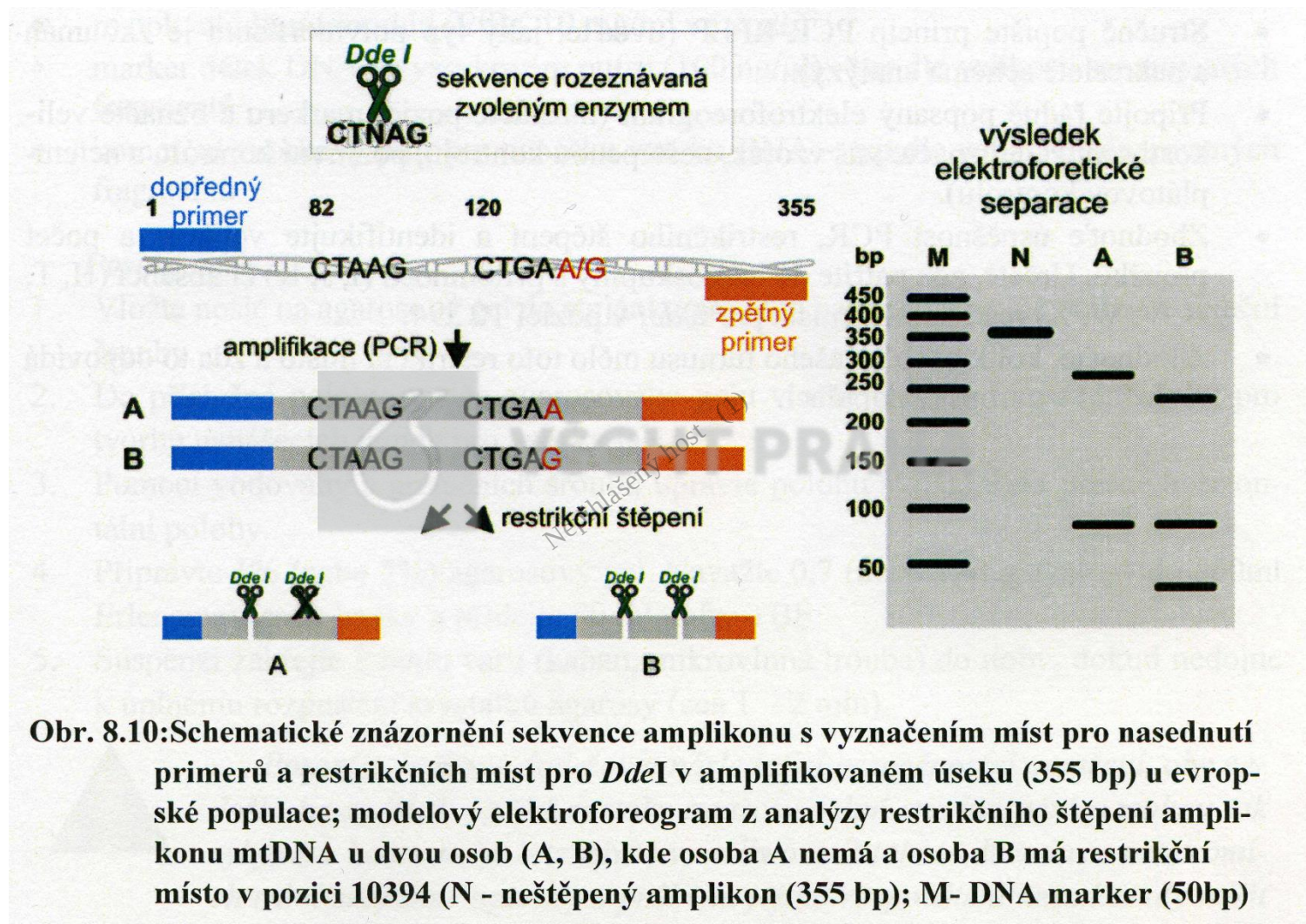
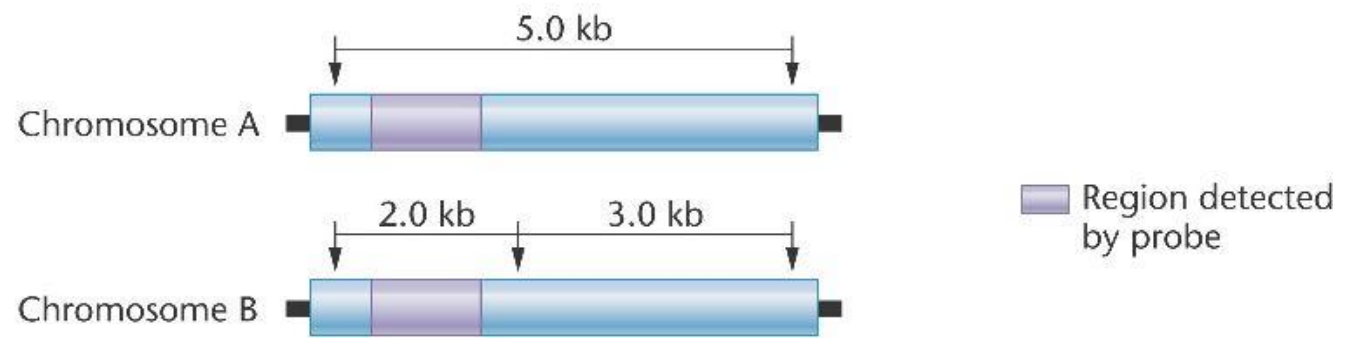
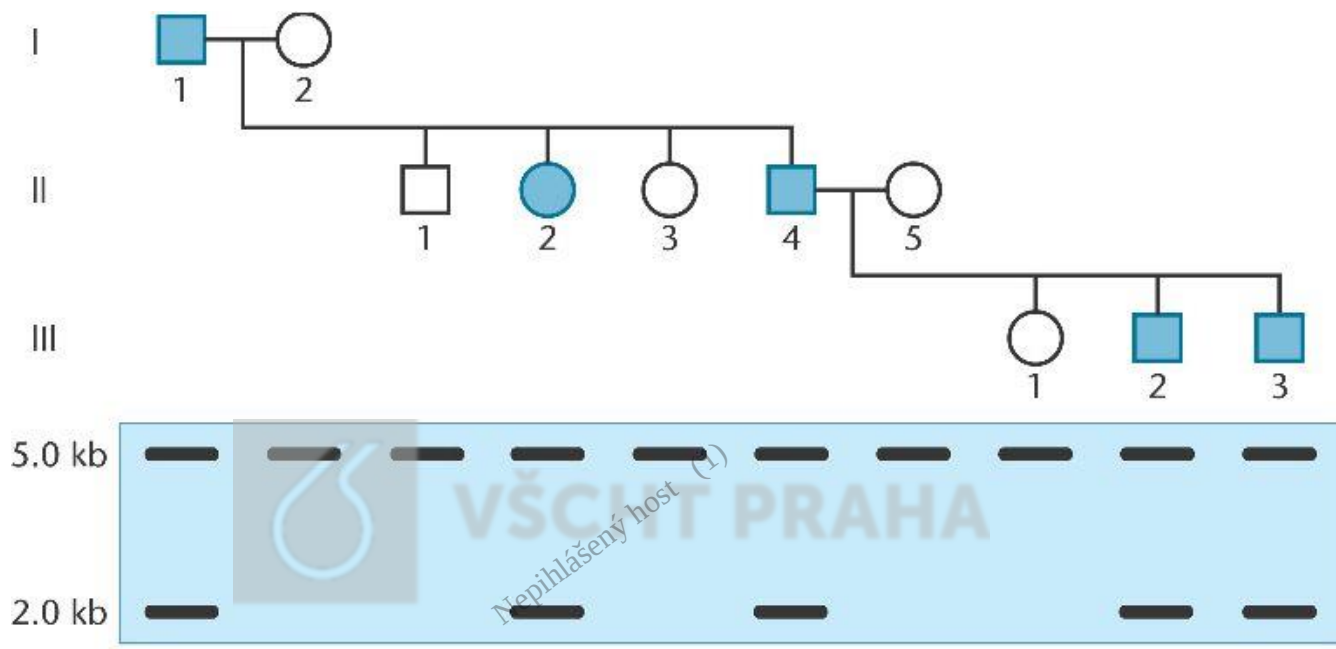


Figure 1. Restriction patterns obtained after restriction digestion with *Cfol*, *Alul*, *Mbol*, *Rsal* and *Mspl* for amplified 16S rDNA of different *Acinetobacter* species

RFLP „restriction fragment length polymorphism“



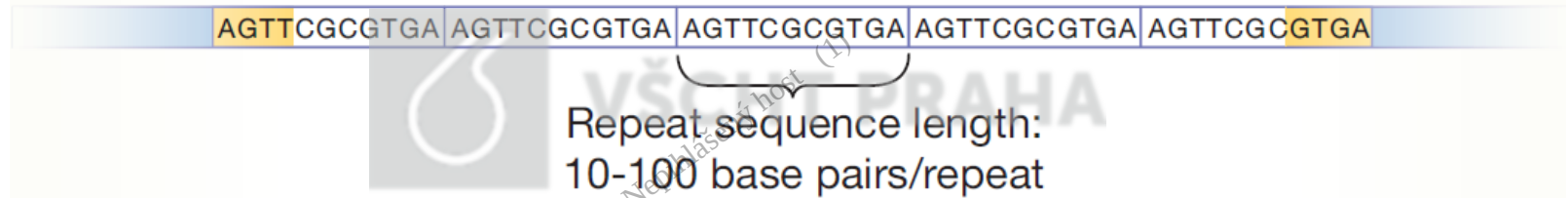


DNA „fingerprinting“

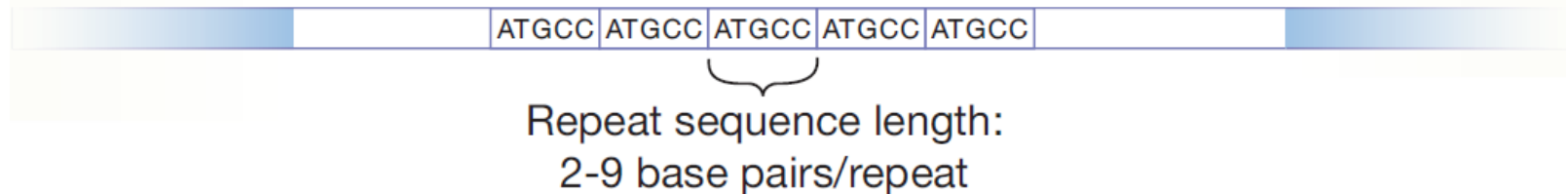
Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)

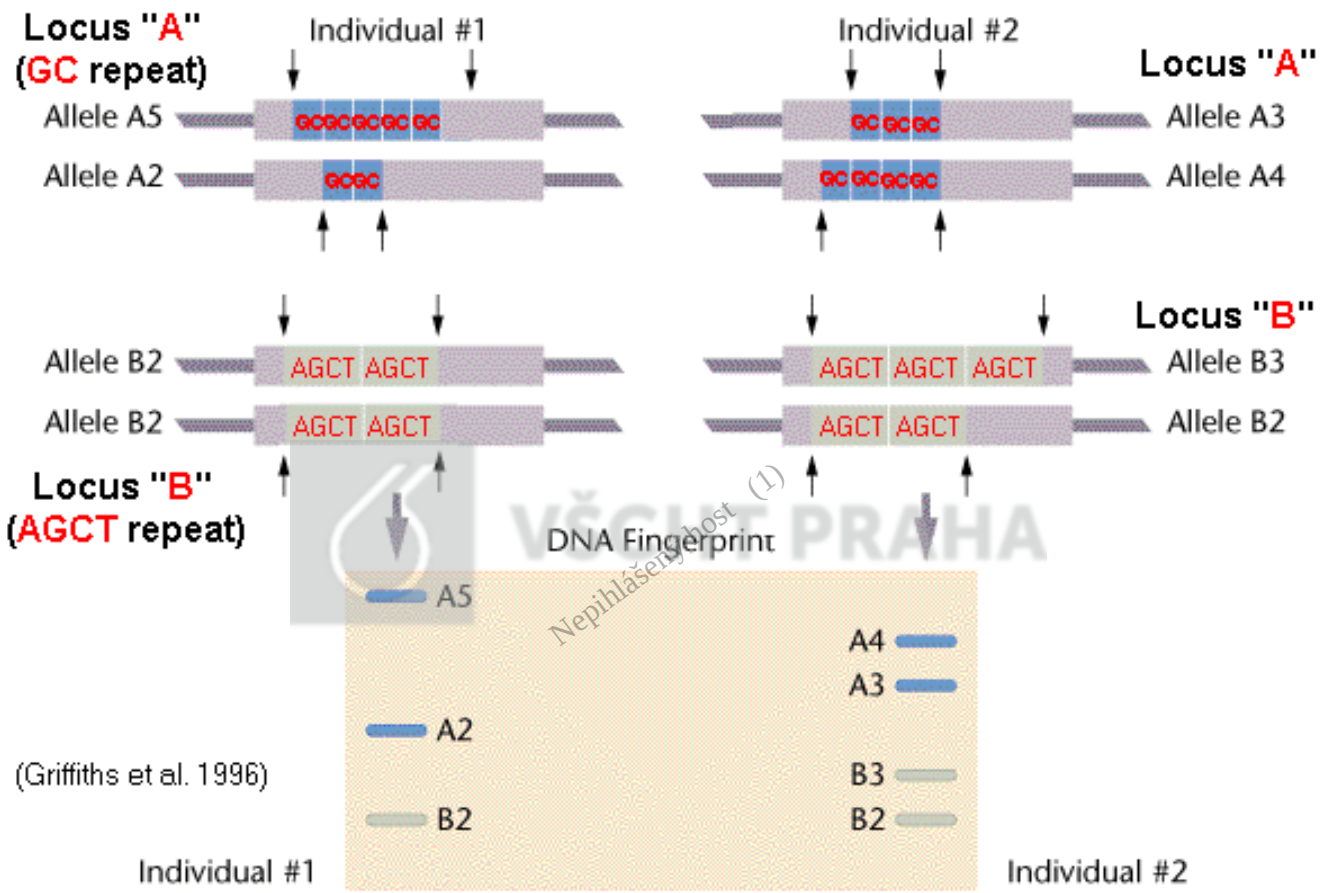
Short tandem repeats (SRT)

Variable Number
of Tandem Repeats (**VNTR**)



Short Tandem Repeats (**STR**)

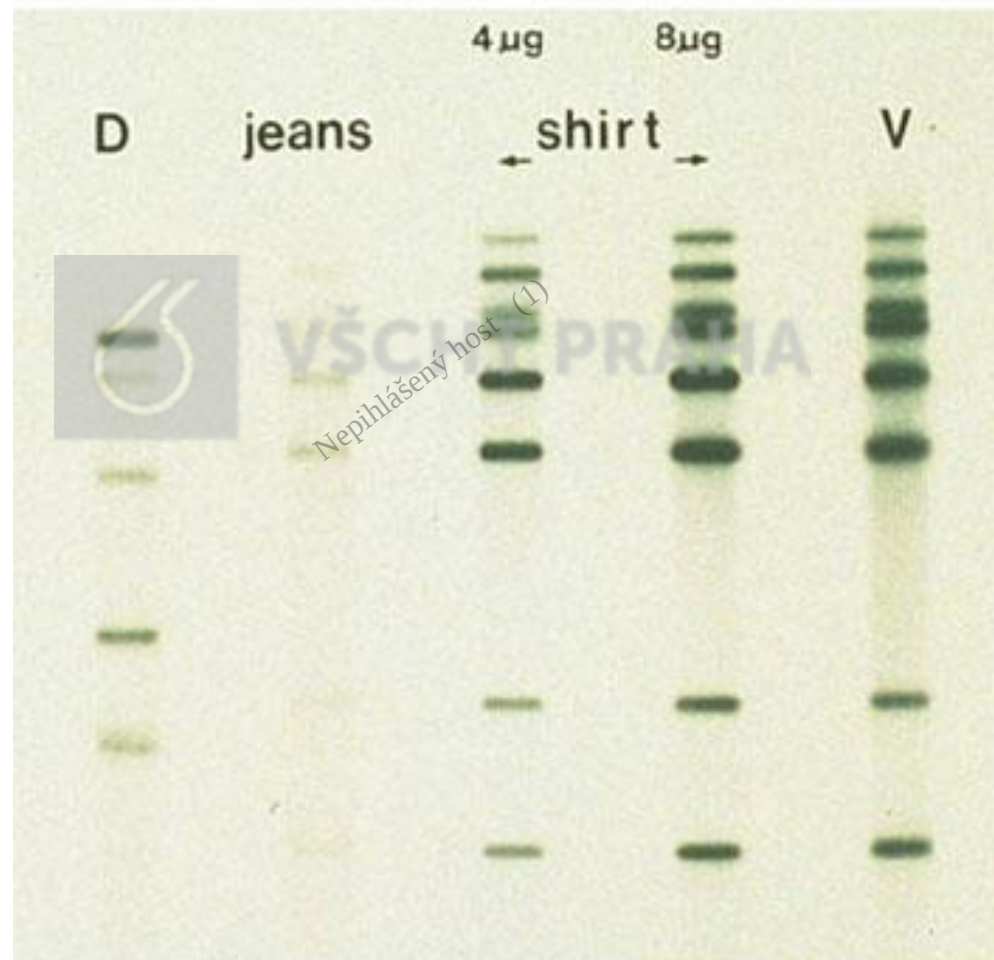




Defendant's
blood (D)

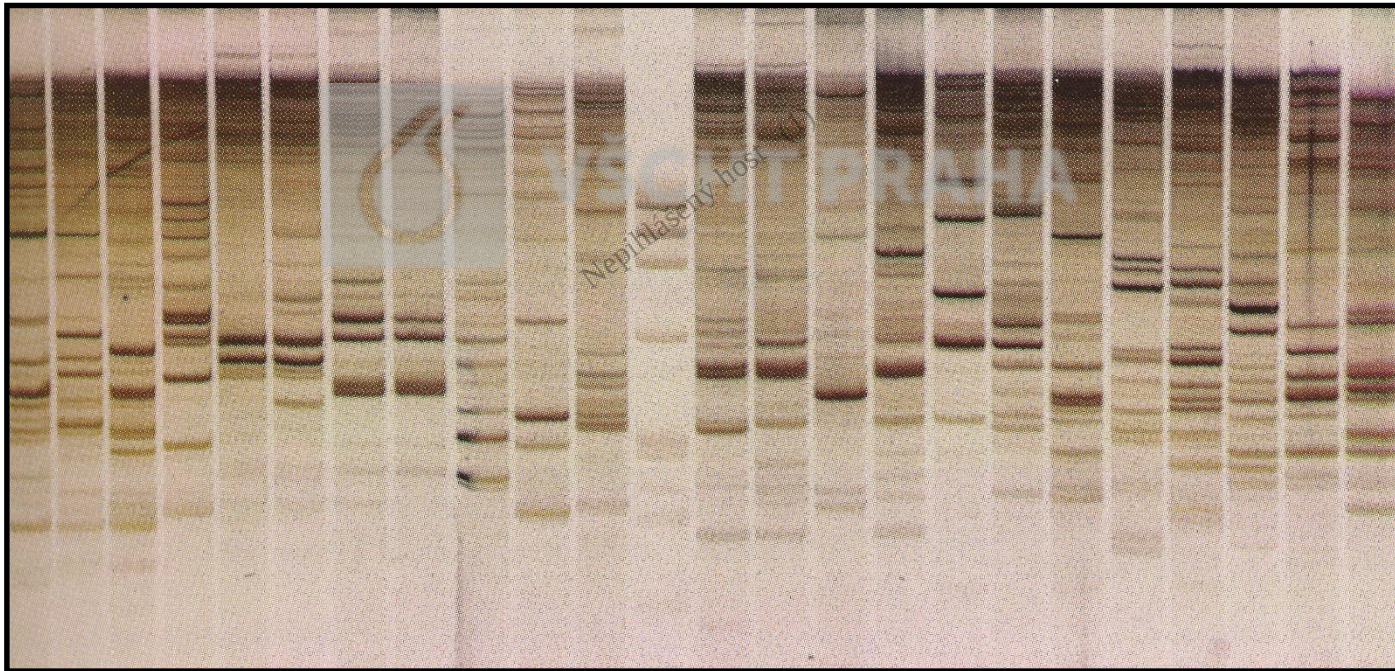
Blood from
defendant's
clothes

Victim's
blood (V)

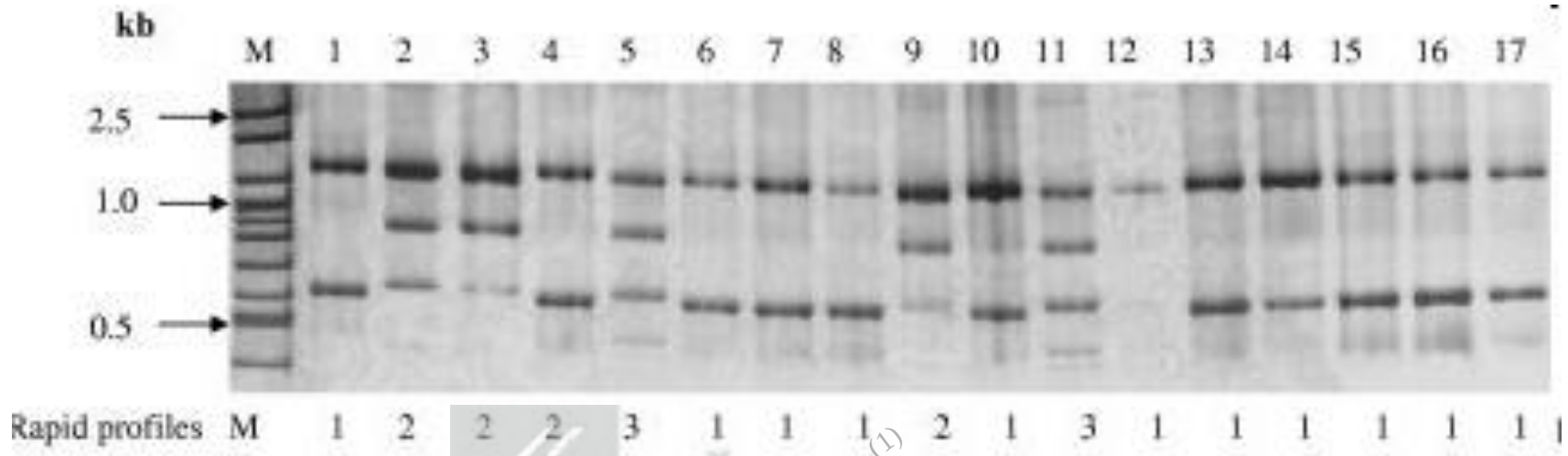


RAPD – náhodně amplifikovaná polymorfní DNA

- rychlá detekce polymorfismu širokého spektra organismů
- 2 krátké primery, nízká teplota → amplifikace sady různých DNA fragmentů o různé velikosti



RAPD různých variet kvasinek



Silver-stained polyacrylamide gel showing three distinct RAPD profiles generated by primer OPE15 for *Haemophilus ducreyi* isolates from Tanzania, Senegal, Thailand, Europe, and North America.

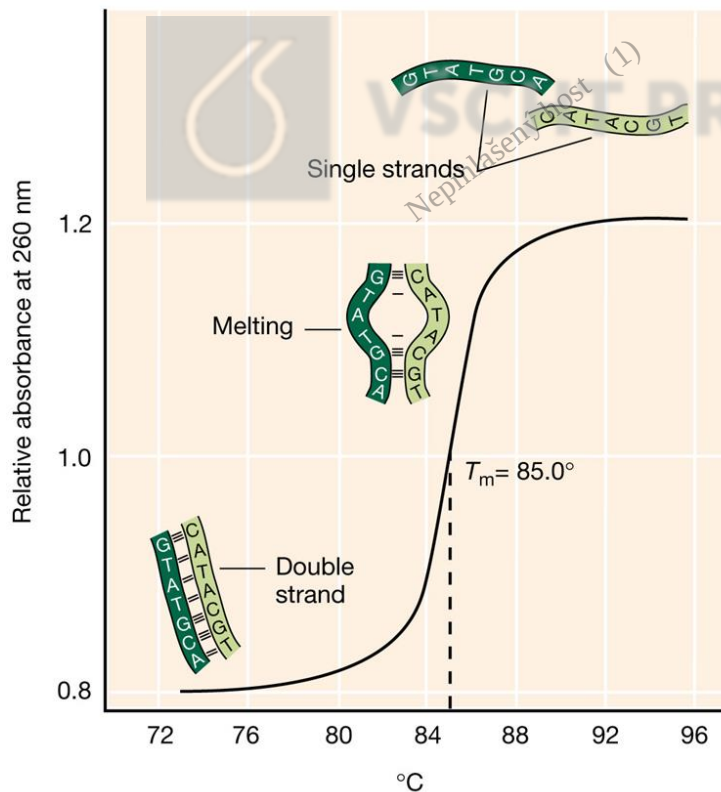
DGGE –ELEKTROFORESA S GRADIENTEM DENATURUJÍCÍHO ČINIDLA

detekce jednobodové mutace

rozdílná elektroforetické pohyblivost částečně denaturovaných molekul
(6 M močovina + 20-40 % formamid)

TGGE –ELEKTROFORESA S TEPLOTNÍM GRADIENTEM

teplotní gradient (katoda – 15 °C, anoda 70 °C)



PCR Amplification

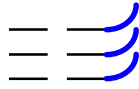
Mixed Population
of DNA



16S rRNA Gene

+

PCR Primers



G+C-Rich
"Clamp"

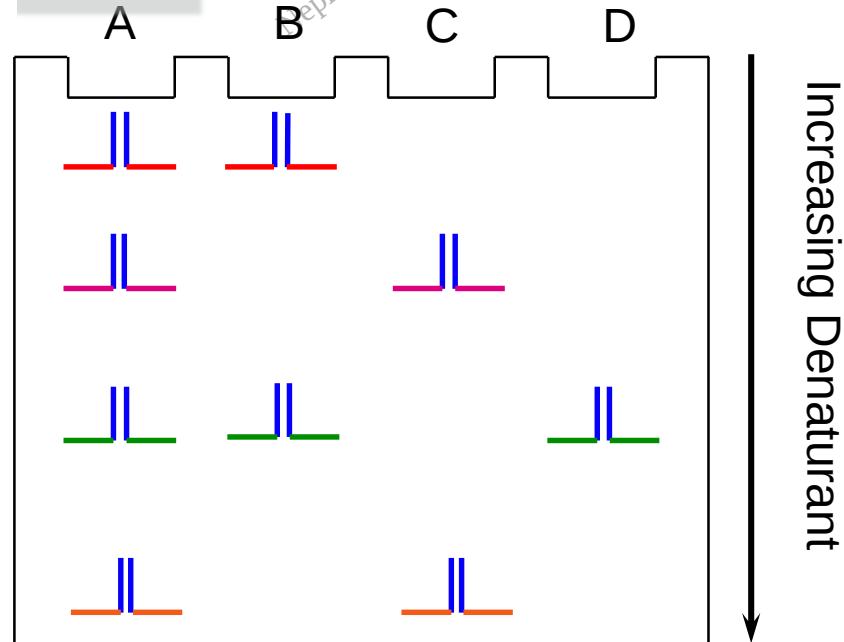


G+C-Tailed
Product



Separate on
Denaturing
Gradient Gel

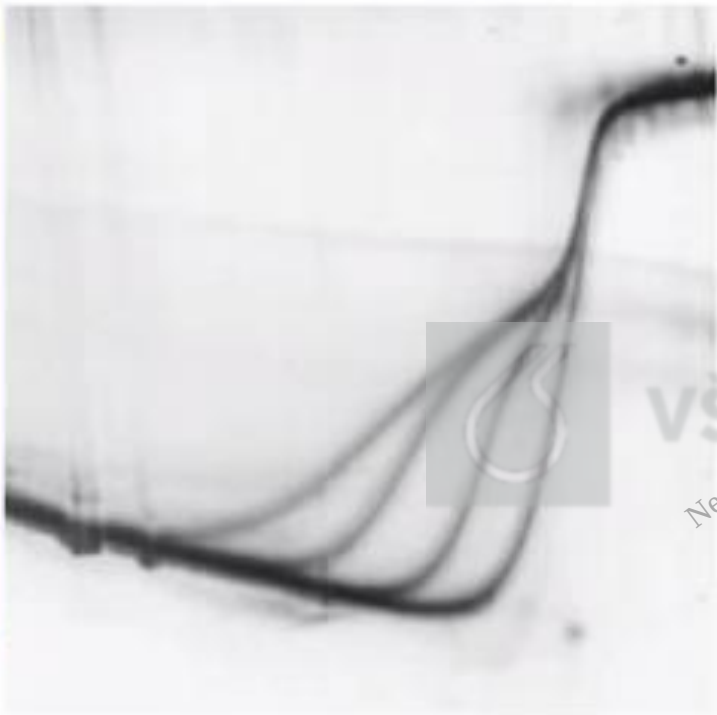
Denaturing Gradient Gel Electrophoresis



Electroforesis



Gradiente



Electroforesis



Gradiente

