

Analýza DNA pomocí nativní agarosové elektroforézy

Elektromigrační separační metody se využívají k separaci makromolekul na základě náboje, konformace nebo velikosti. Migrace nabitě částice v elektrickém poli je ovlivňována interakcí mezi ionty a závisí především na celkovém náboji, velikosti a tvaru částice a na viskozitě prostředí. Elektromigrační metody využívají dvou elektrokinetických jevů, elektroforézy a elektroosmózy. Při styku pevných povrchů, které mohou nést elektrické náboje, s roztokem obsahujícím nabitě částice se vytváří elektrické dvojvrstvy. V elektromigračních separačních metodách je na toto prostředí připojeno stejnosměrné elektrické pole, které poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb. Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, neboť nabitě částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí.

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto pole se vytváří vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. V zónové elektroforéze je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému. Vzorek se dává do určitého místa tohoto systému. Kationty migrují k zápornému pólu, anionty ke kladnému pólu. Neutrální částic se nepohybují. V průběhu separace se vytvářejí oddělené zóny na základě odlišné rychlosti migrace složek vzorku.

Elektroforetická pohyblivost μ nabitě částice je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Pokud jsou na začátku separace částice v jednom místě, dostávají se během separace dopředu nabitě částice s vyšší pohyblivostí a opoždují se naopak ty částice, které mají pohyblivost menší.

Na nabitou částici o náboji Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly: elektrická síla F_1 , která ji uvádí do pohybu, a odpor viskózního prostředí F_2 , který ji brzdí.

$$F_1 = QE$$

$$F_2 = kv$$

Koeficient k závisí na tvaru a velikosti částice a na viskozitě prostředí η .

Pokud je v počátečním okamžiku rychlost v nulová, částici uvede síla F_1 do zrychleného pohybu. S rostoucí rychlostí v se zvětšuje síla F_2 , dokud se nevyrovná síle F_1 . Nastane stacionární stav, ve kterém se nabitě částice pohybují stálou rychlostí.

$$F_1 = F_2 \rightarrow QE = kv$$

Pro elektroforetickou pohyblivost vychází vztah:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{Q}{k}$$

V roztocích slabých elektrolytů jsou vedle sebe disociované a nedisociované molekuly, podíl nabitých částic je určen stupněm disociace α . Molekula takového elektrolytu proto vykazuje efektivní elektroforetickou pohyblivost danou součinem $\alpha\mu_e$. Disociaci slabých kyselin a zásad lze měnit volbou pH prostředí, a tím také ovlivnit separaci těchto látek.

V současné době se moderní biochemický, molekulárně-biologický ani biotechnologický výzkum neobejde bez nejpoužívanější separační techniky – elektroforézy. Nejčastěji je využívána elektroforéza gelová k izolaci a analýze nukleových kyselin či proteinů. Hlavním nositelem náboje v nukleových kyselinách jsou záporně nabitě fosfátové skupiny. Proto se nukleové kyseliny (DNA, RNA) pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě. Elektroforéza většinou probíhá ve vhodně zvoleném nosiči, jako je celulóza nebo polymerní gel.

Jako nosiče pro analýzu nukleových kyselin či proteinů pomocí gelové elektroforézy se používají agarosové nebo polyakrylamidové gely. U těchto je možné ovlivnit velikost pórů a tím dosáhnout dělení nejen z hlediska elektroforetické pohyblivosti ale i na základě velikosti molekuly. Agarosové gely jsou vhodné zejména pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po 50 kb. Naopak polyakrylamidové gely jsou využívány k separaci proteinů. Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme gelovou elektroforézu horizontální a vertikální, které mají deskové uspořádání a kapilární elektroforézu, kde je gel uvnitř kapiláry.

Při posuzování elektroforetické pohyblivosti molekuly DNA není třeba se zabývat velikostí náboje, protože ten je rovnoměrně rozložen. Velikost molekuly DNA či jejího fragmentu o neznámé velikosti lze určit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí fragmentů či molekul DNA o známé velikosti, tzv. standardy velikosti nebo hmotnostními standardy. Jedná se o restriční fragmenty plazmidových molekul, jejichž velikost je přesně stanovena.

Výsledek separace je nutné nějakým způsobem zobrazit, jelikož molekuly DNA nejsou pouhým okem v gelu viditelné. Využívá se možnosti barvení molekul DNA nejčastěji ethidium bromidem (pozor silně mutagenní), který se interkaluje mezi sousední páry bází DNA šroubovice. Při ozáření takto obarveného gelu ultrafialovým světlem se výsledek elektroforetické separace jeví jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA. Dále se používá celé spektrum barev jako Syber Green nebo GelRed, apod. Molekuly DNA lze značit i radioaktivně a výsledek separace je pak zaznamenán autoradiograficky. K detekci

poloh fragmentů DNA lze rovněž využít hybridizace se značenou sondou. V případě separace v polyakrylamidovém gelu je využíváno barvení stříbrem.

Gelovou elektroforézou je možné využít ke studiu konformace molekul DNA. Lze tak odlišit kovalentně uzavřené kružnicové molekuly DNA od molekul lineárních nebo od otevřených kružnic. Nadšroubovicová forma, otevřená kruhová forma a lineární forma DNA téže molekulové hmotnosti se pohybuje agarosovým gelem různou rychlostí.

Úloha 1: Proved'te separaci DNA izolované z předchozího cvičení v agarosovém gelu.

Pomůcky: Erlenmayerovy baňky, předvážky, lžičky, elektroforetická aparatura, odměrný válec, mikropipety, špičky, mikrovlnná trouba, UV transluminátor, fotoaparát

Chemikálie: TAE 50x, agarosa, ethidium bromid, bromfenolová modř 1x, voda

Postup:

1. Z hodnot absorbance z předchozího cvičení vypočítejte koncentraci vyizolované DNA v roztoku.
2. Spočítejte kolik mikrolitrů vzorku budete odebírat, abyste na gelovou elektroforézu nanášeli 0,5 µg DNA.
3. Spočítejte, jak budete ředit zásobní roztok TAE 50x, abyste dostali pracovní roztok o koncentraci 1x.
4. Spočítejte kolik gramů agarosy budete navažovat, abyste získali roztok 1% agarosy v 40 ml TAE 1x.
5. Připravte si elektroforetickou aparaturu a vaničku pro nalití gelu. Do vaničky vložte hřebínek, který Vám po zatuhnutí gelu vymezí jamky pro nanesení vzorků DNA.
6. Odvažte spočítané množství agarosy do erlenmayerovy baňky a zalijte jej 40 ml TAE 1x.
7. Agarózu dejte rozvařit na 5 min do mikrovlnné trouby, hlídejte, ať se neodpaří veškerá tekutina, v případě potřeby ji doplňte. Gel nechejte třikrát zavřít.
8. Po zchlazení gelu na cca 40-50 °C přidejte 8 µl ethidium bromidu (EtBr; zásobní roztok o koncentraci 20 mg/ml – POZOR, pracujte v rukavicích) a promíchejte. Gel vlijte do připravené vaničky a nechte tuhnout po dobu cca 30 min.
9. Ze ztuhlého gelu opatrně vyjměte hřebínek a gel ve vaničce ponořte do elektroforetické vany. Vanu naplňte puřem TAE 1x s 20 µl EtBr po rysku označující maximální naplnění.
10. Spočítejte kolik bromfenolové modři 6x (BFM) budete přidávat ke vzorkům DNA, abyste získali 1x koncentrovanou BFM v každém vzorku.

11. Vzorky obarvené BFM pipetujte do jamek v gelu.
12. Nakonec naneste na gel i standard molekulové hmotnosti.
13. Elektroforetickou vanu uzavřete víkem, připojte ke zdroji a nastavte konstantní napětí 60 V.
14. Spusťte separaci tlačítkem RUN a vzorky nechte dělit tak dlouho, aby zóna BFM doputovala přibližně do poslední čtvrtiny gelu (cca 1 hod).
15. Vypněte zdroj a odpojte elektroforetickou aparaturu.
16. Gel vytáhněte z vaničky a opatrně opláchněte destilovanou vodou.
17. Výsledek separace si prohlédněte pomocí transluminátoru a gel vyfotografujte.
18. Podle standardu určete přibližnou velikost vyizolované DNA.