

CVIČENÍ III.

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA A SEKVENACE PCR AMPLIKONŮ

Gelová elektroforéza patří mezi nejpoužívanější separační techniky používané k analýze nukleových kyselin (DNA, RNA) a proteinů. Jejím principem je pohyb nabytých molekul v elektrickém poli za využití pórů gelu, skrze které se fragmenty makromolekul pohybují různou rychlostí na základě své velikosti a dalších faktorů. Nukleové kyseliny nesou záporný elektrický náboj, a proto se pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Dle typu provedení rozlišujeme elektroforézu horizontální, vertikální a kapilární. Vlastní gelová elektroforéza probíhá v elektroforetické vaně, která je na každém konci opatřena elektrodou (katodou a anodou) z platinového drátu, a je připojena ke zdroji elektrického napětí. Elektroforetická vana je naplněna vhodným elektrolytem (elektroforetickým pufrům), který je vodivý a umožňuje tok elektronů mezi elektrodami. K vizualizaci separovaných molekul DNA se nejčastěji používají interkalační barviva, která se vmezeřují mezi sousední páry bází a vytvářejí komplex s nukleovými kyselinami, které po osvětlení UV zářením fluoreskují.

Sekvenování je metoda sloužící k určení pořadí nukleotidů v molekule DNA (i RNA). V dnešní době je známo mnoho metod sekvenování (Maxam–Gilbertova metoda, Sangerova metoda, pyrosekvenování, metody označované termínem Next-Generation Sequencing, atd.), které se mezi sebou liší nejen principem metody, ale i náročností provedení, velikostí produkovaných dat, přesností či cenou. Sangerova metoda sekvenování patří mezi první známé metody sekvenování. Jedná se o modifikovanou metodu PCR, kdy jsou do PCR směsi zařazeny kromě deoxyribonukleosidtrifosfátů i dideoxynukleotidtrifosfáty, které nemají ve svojí struktuře na 3'-konci hydroxylovou skupinu. Po začlenění dideoxynukleotidtrifosfátů do syntetizovaného řetězce se nemohou vázat na hydroxylovou skupinu další nukleotidy, což vede k ukončení syntézy komplementárního řetězce. Takto vznikají různé dlouhé fragmenty DNA, které jsou vizualizovány gelovou elektroforézou. Pozice jednotlivých fragmentů na gelu odpovídají pozicím nukleotidů v sekvenované DNA. Metoda se nejdříve prováděla ve čtyřech zkumavkách zvlášť pro každý nukleotid. Časem byla tato metoda zjednodušena a automatizována, což umožnilo syntézu DNA v jedné reakci s využitím fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (každý dideoxynukleotid nese svou barevnou značku). Analýza takto vzniklých fragmentů pak probíhá v automatických sekvenátorech, kde dochází během kapilární elektroforézy k detekci laserem indukované fluorescence. Sangerova metoda se používá pro určitý typ analýz pro svoji přesnost a finanční nákladnost dodnes.

Reference:

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2005): Základy buněčné biologie. Espero Publishing. 645 s.
- Šmarda J., Doškař J., Koptíková J., Pantůček R., Růžičková V.** (2005): Metody molekulární biologie. MUNI Press, Brno. 188 s.
- Snustad D. P., Simmons M. J.** (2009): Genetika. MUNI Press, Brno. 894 s.
- Dastyh M.** (2007): Instrumentální technika. MUNI Press, Brno. 132 s.

ÚLOHA 1: Gelová elektroforéza

Postup přípravy 1,5 % agarózového gelu:

- 1) Do baňky typu Erlenmeyer odvažíme 1,5 g agarózy.
- 2) Skleněným válcem odměříme 100 ml TBE pufru, nalijeme jej do baňky a kroužením promícháme.
- 3) Baňku vložíme do mikrovlnné trouby a ohříváme při teplotě nastavené na maximální ohřev po dobu 2 minut (jakmile začne obsah kádinky bublat, přerušíme ohřev a promícháme obsah kádinky v ruce s nasazenou rukavicí).
- 4) Po 2 minutách ohřevu vyndáme baňku z mikrovlnné trouby a opatrně ji ochladíme pod tekoucí vodou na teplotu 60 °C (teplota, při které udržíme kádinku několik sekund přiloženou ke hřbetu ruky).
- 5) Do gelu napipetujeme 10 µl barviva MIDORI GREEN a krouživým pohybem baňku promícháme.
- 6) Připravíme si tvořítko s hřebínkem a přelijeme do ni rozehřátý agar z baňky do výšky minimálně 8 mm.
- 7) Špičkou od pipety odstraníme případné bubliny v gelu.
- 8) Agar ztuhne asi po 30 minutách.

Postup horizontální gelové elektroforézy:

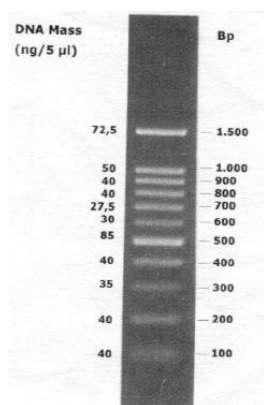
- 1) Po ztuhnutí gelu vyjmeme hřebínek a gel přeneseme ve formě, ve které tuhl do elektroforetické vany. Vanu zalijeme TBE puftrem, tak aby byl celý gel ponořený.
- 2) Do jamky v gelu nanese (novou špičkou) opatrně 5 µl vzorku (PCR produktu). S pipetou je třeba manipulovat opatrně, aby nedošlo k protrhnutí gelu. Každý nanáší svůj vzorek.
- 3) Do jedné z jamek v gelu (nejlépe do střední) nanese 3 µl velikostního DNA markeru.
- 4) Do poslední jamky v gelu nanese 10 µl směšného vzorku PCR produktu (směšný vzorek PCR produktu připravíme smícháním všech vzorků ve cvičebně).
- 5) Zapojíme elektroforetickou vanu do zdroje a pustíme elektrický proud při konstantním napětí 120 V po dobu 25 minut.
- 6) Po ukončení elektroforézy přemístíme gel na UV-transluminátor a pod UV zářením odečteme výsledek. V rámci bezpečnosti je třeba pozorovat gel přes plastový kryt.

ÚKOL 1:

Zakreslete výsledek gelové elektroforézy (jaké produkty jste detekovali, v jaké výšce, vyznačit jamku s pozitivní a negativní kontrolou, zakreslit hmotnostní standard).



Obrázek: Hmotnostní DNA standard



ÚLOHA 2: Příprava vzorku pro sekvenace PCR amplikonů

Postup:

- 1) Přeneseme 20 µl PCR produktu *bla*_{CTX-M} do popsané eppendorf zkumavky.
- 2) Připravíme si kit na purifikaci PCR produktů (např. Geneaid Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit)
- 3) K PCR produktu přidáme 130 µl DF Bufferu a zvortexujeme.
- 4) Nachystáme si DF kolonku do sběrné zkumavky a přeneseme nachystaný PCR produkt do kolonky.
- 5) Centrifugujeme při 12 000 otáčkách po dobu 1 minutu.
- 6) Obsah sběrné kolonky vylejeme do směšného odpadu a vrátíme kolonku do sběrné zkumavky.
- 7) Napipetujeme 600 µl Wash Buffer (s přidaným ethanolem) do středu kolonky a počkáme 1 minutu.
- 8) Centrifugujeme při 12 000 otáčkách po dobu 1 minutu.
- 9) Obsah sběrné kolonky vylejeme do směšného odpadu a kolonku vrátíme do sběrné zkumavky.
- 10) Centrifugujeme při 12 000 otáčkách po dobu 3 minut (dojde k vysušení kolonky).
- 11) Přeneseme kolonku do nové popsané eppendorf zkumavky.
- 12) Napipetujeme 25 µl PCR vody do středu kolonky a počkáme 5 minut.
- 13) Centrifugujeme při 12 000 otáčkách po dobu 2 minut (dochází k eluci DNA fragmentů).
- 14) Produkt skladujeme při -20 °C (do doby než jej pošleme na sekvenaci).
- 15) Na sekvenace napipetujeme 7,5 µl přečištěného PCR produktu a 2,5 µl příslušného primeru do popsané safe-lock eppendorf zkumavky (pokud sekvenujeme primery z obou směrů amplikonu, potřebujeme nachystat pro jeden vzorek 2 zkumavky). Takto nachystané vzorky odešleme do firmy Macrogen pro sekvenační analýzu (metoda Sangerova sekvenování).



Obrázek: Výstup Sangerova sekvenování amplikonu ve formě chromatogramu

