

1 Gelová chromatografie a chemické modifikace bílkovin

1.1 Teoretický úvod

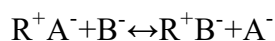
Chromatografické metody patří mezi separační techniky, které využívají dělení složek mezi dvěma fázemi, mobilní a stacionární. Fáze pohyblivá je označována jako *fáze mobilní*, může ji tvořit buď kapalina, nebo plyn. Fáze nepohyblivá, *stacionární*, může mít v chromatografii velmi rozdílnou formu:

- částice tuhé fáze o velikosti jednotek mikrometrů,
- tenká vrstvička kapaliny nanesená na tuhých částicích,
- film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry,
- porézní materiál.

Při dělení dochází k opakovanému transportu molekul složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní. Doba, po kterou průměrná molekula dané složky setrvává na povrchu sorbentu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbentem a určuje pořadí, v jakém je složka vymývána (eluuje) z kolony. Čím větší interakce, tím později složka eluuje, a tím má delší retenční čas. Chromatografické techniky, se liší typem mobilní fáze, stacionární fáze a mechanismem interakce mezi dělenou látkou a stacionární fází. V bioanalytických metodách se nejčastěji využívají techniky s kapalnou mobilní fází, tzv. kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography, LC).

Dle interakce dělená látka – stacionární fáze lze rozlišit chromatografické metody na:

- **Adsorpční chromatografii** – při tomto uspořádání je pevný adsorbent obtékán vhodným rozpouštědlem, které unáší analyzovanou směs látek. Na povrchu adsorbentu dochází k různě silné adsorbci těchto látek a tím k jejich rozdělení.
- **Rozdělovací chromatografii** - principem je dělení látek mezi dvě navzájem nemísitelná nebo omezeně mísitelná rozpouštědla a je charakterizováno rozdělovací konstantou K, která je rozdílná pro jednotlivé složky směsi a liší se pochopitelně i pro různé systémy rozpouštědel. Volbou složení těchto systémů lze ovlivnit účinnost rozdělení složek směsi.
- **Afinitní chromatografii** (specifické interakce ligandu) - je založena na biochemických interakcích, jako jsou interakce enzym – substrát či protilátka – antigen, které probíhají s vysokou selektivitou. Princip je založen na tom, že příslušný substrát či antigen se chemickou reakcí naváže na určitý sorbent, kterým se pak naplní kolona. Enzym nebo protilátka jsou selektivně vychytávány z analyzované směsi a následně mohou být z kolony vymyty.
- **Ionexovou (iontoměničovou) chromatografii** - je určena pro separaci látek nesoucích náboj. Při výměně iontů se ionty, které jsou elektrostaticky vázány k pevnému a chemicky inertnímu podkladu reversibilně vyměňují za ionty z roztoku:



Afinita iontů k ionexu není stejná, ale závisí na velikosti náboje a na poloměru hydratovaného iontu, a tento fakt je základem separace látek ionexovou chromatografií.

- **Gelovou permeační chromatografií** – viz kapitola 1.1.1

1.1.1 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie je jednou z nejdůležitějších metod v preparativní i analytické chemii biopolymerů, jedná se o chromatografickou metodu, v níž se jako stacionární fáze používá přírodní nebo syntetický neionizovaný gel.

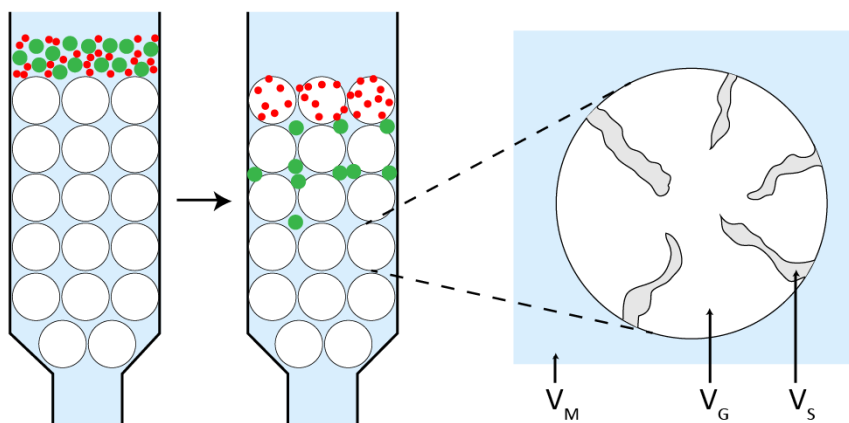
V praxi se lze setkat s různými názvy pro gelovou chromatografií:

- molekulová vylučovací chromatografie (kapalinová vylučovací chromatografie, liquid exclusion chromatography),
- gelová filtrační chromatografie,
- gelová permeační chromatografie,
- gelová filtrace.

Z teoretického hlediska je nejvhodnější termín molekulová vylučovací chromatografie (kapalinová vylučovací chromatografie, liquid exclusion chromatography). Jedná se o rozdělovací chromatografií, kdy se látky dělí mezi mobilní kapalnou fázi a stacionární kapalnou fázi stejného složení, která je obsažena v pórech gelových částic a je omezeně přístupná.

Termín gelová filtrace se užívá většinou pro oddělování látek s velmi rozdílnými molekulovými hmotnostmi (skupinová separace). Využívá se pro dělení nízkomolekulárních látek od polymerů, např. odsolování bílkovin, odsolování polysacharidů, odstranění extrakčního činidla, oddělení koenzymu, oddělení inhibitoru od enzymu, ukončení reakce mezi nízkomolekulární látkou a polymerem. Název gelová permeační chromatografie se používá často v praxi a označuje nejčastěji proces separace látek s blízkými molekulovými hmotnostmi (frakcionace). Využívá se k purifikaci biopolymerů např. při purifikaci IgG a IgM ze séra. Gelová filtrační chromatografie využívá hydrofilní gel a vhodný vodný eluční roztok, naopak gelová permeační chromatografie využívá hydrofobní gel a jako eluční roztok organické rozpouštědlo (pro oddělování látek s blízkými molekulovými hmotnostmi).

Princip gelové chromatografie spočívá v separaci látek na základě rozměrů molekul (Obr. 1). Na pórovitém gelu (molekulovém síti) dochází k tzv. sterickému vyloučení (exkluzi) větších molekul (podle rozměru pórů gelu), naopak malé molekuly pronikají do nitra částic gelu (odtud pojem permeace). Velké molekuly procházejí sloupcem rychleji a látky o menších molekulových hmotnostech se eluují později v pořadí svých zmenšujících se relativních hmotností. Látky o nižších molekulových hmotnostech, než je velikost nejmenších pórů, se od sebe neoddělí.



Obr. 1 Separace vysokomolekulární a nízkomolekulární látky na molekulovém sítu a schématické znázornění částice molekulového síta s póry (V_M – mrtvý objem, V_S – objem stacionární fáze, V_G – objem gelové matrice).

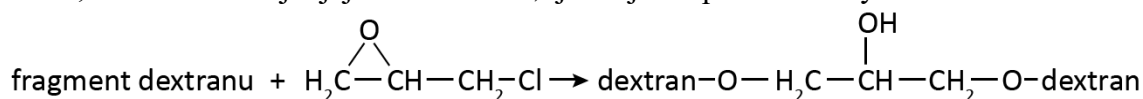
Optimální gel by měl mít následující vlastnosti:

- inertní matrice gelu pro dělení složky i pro eluční roztoky,
- chemicky stabilní gel během několika roků, při různém pH a při různé teplotě,
- mechanicky stabilní gel, aby se při větším tlaku nedeformoval,
- malé množství ionizovaných skupin,
- velikost gelových částic nesmí být ani příliš malá (rozdělení je přesnější, ale pomalejší) ani příliš velká (rozdělení je rychlejší, ale může být nepřesné).

Ideální matrice pro gelovou chromatografii by měla být tvořena částicemi hydrofilního polymeru, které jsou inertní, pevné, bez elektrického náboje a s jednotnou velikostí. Vhodnými nosiči pro gelovou chromatografii jsou přírodní polymery, jako například dextran nebo agarosa, které bývají chemicky stabilizovány křížovými vazbami (zesíťování, "cross-linking"). Používají se rovněž syntetické polymery jako je polyakrylamid. Tyto polymery jsou dostupné jako částice o různých rozměrech a velikosti pórů, která určuje rozsah pro optimální separaci molekulových hmotností.

Pro gelovou chromatografii se používají následující materiály:

- **Sephadexy** – fragmenty dextranu (polysacharid o vysoké relativní molekulové hmotnosti 10^7 – 10^8) jsou zesíťovány příčnými vazbami pomocí epichlorhydrinu (Obr. 2). Změnou poměru dextran : epichlorhydrin lze ovlivnit zesíťování a tím velikost pórů. Různé typy jsou označeny písmenem G a číslem, které značí desetinásobek objemu vody, který nasaje 1 g gelu ve formě prášku při bobtnání. Jsou vhodné pro odsolování i pro separaci bílkovin (podle velikosti částic). Sephadexy se dodávají v různé zrnitosti částic, která ovlivňuje jejich vlastnosti, jako je o průtoková rychlost a rozlišení.



Obr. 2 Zesíťování dextranu.

- **Sepharosy** – na bázi agarosy, která je součástí agaru (agarosa + agaropektin; *agarosa*, nerozvětvený polysacharid složený z D-galaktopyranosy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranosy, *agaropektin*, kyselý rozvětvený polysacharid). Sepharosy se liší od jiných typů molekulových sít tím, že jednotlivé řetězce polymeru nejsou vázány kovalentně, ale pouze slabými silami, mají velké póry a do jisté míry kyselý charakter. Polysacharidy po zahřátí a ochlazení vytvoří dvojité spirály a tím vznikne stabilní gel. Používají se pro dělení proteinů s Mr nad 200 000.
- **Superosa** je materiál na bázi vysoce zesíťované agarosy s vysoce jednotnou velikostí částic a velkou stabilitou. Dodávají se dva typy s širokým rozsahem frakcionace. Superose 6 pro 5–5 000 kDa a Superose 12 pro 1–300 kDa.
- **Superdex** obsahuje vysoce zesíťovanou agarosu připojenou k dextranu a má významnou mechanickou odolnost.
- **Bio-gely P** se připravují polymerací akrylamidu a methylenbisakrylamidu. Výhodou v porovnání se Sephadexy je vyšší rozsah frakcionace, lepší průtok a nevýhodou nižší rozlišovací schopnost.
- **Sephacryl HR** je svou chemickou podstatou allyl-dextran zesíťovaný bis-akrylamidem. Gelové částice jsou velmi odolné a mají průměr 25–75 μm. Sephacryl se dodává s rozmanitými rozměry pórů pro frakcionaci v rozsahu 1–10 000 kDa.
- **Bio-Beads** vznikají polymerací styrenu a divinylbenzenu. Jsou vhodné na separaci lipofilních polymerů s použitím organických rozpouštědel jako elučních činidel. Frakcionační rozsah je 400 až 14 000.
- **Spheron** vzniká polymerací hydroxymethylmetakrylátu a ethylendimetakrylátu. Je to pevný gel, který bobtná ve vodě i v organických rozpouštědlech.
- **Ultrogel** obsahuje agarosu a polyakrylamid. Je chemicky velmi odolný a s poměrně velkým frakcionačním rozsahem 1 000 až 23 000 000.
- **Separon** obsahuje glykometakrylát.
- **Bio-Glass, Controlled Pore Glass** obsahují skleněnou porézní náplň.
- **Porasila Spherosil** obsahují porézní silikagel.

Nejčastější využití mají molekulová síta v bioanalytice při:

- separaci proteinů ze směsi,
- odsolení biopolymeru,
- zakoncentrování vzorků biopolymerů – přidavkem suchého Sephadexu k roztoku začnou částice rozpouštědla pronikat do bobtnavého materiálu a dosáhne se tak snížení objemu,
- při charakterizaci proteinů
 - stanovení molekulové hmotnosti,
 - asociační konstanty specifické vazby k ligandu.

1.1.2 Chromatografie na koloně

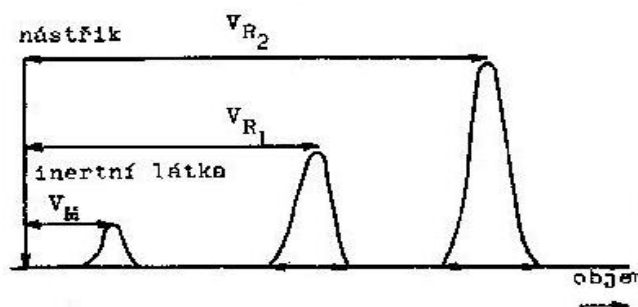
Při sloupcové chromatografii (chromatografie na koloně) je chromatografický materiál umístěn do chromatografické kolony (skleněná nebo kovová trubice) a vytvoří tak sloupec, na němž probíhá dělení. Po aplikaci vzorku na kolonu dochází vlivem toku mobilní fáze k pohybu

jednotlivých složek kolonou a k jejich separaci. Náplň kolony je různá podle toho, o jaký typ chromatografie se jedná. Kolony je možné naplnit v laboratoři nebo lze zakoupit kolony již naplněné, které jsou dodávány řadou firem. To platí zejména o kolonách pro chromatografické techniky, kdy dělení probíhá za zvýšeného tlaku (HPLC) na sorbentech s velmi malým průměrem částic (několik mikronů) a správné naplnění kolony je jedním z rozhodujících faktorů pro kvalitu separace látek. Hlavní podmínkou je, aby kolona byla naplněna kontinuálně a náplň byla v celé své délce kompaktní bez jakýchkoliv heterogenit. Moderní zařízení pro kapalinovou sloupcovou chromatografii se skládá z rezervoárů mobilních fází, dávkovače vzorku, kolony s chromatografickým materiálem, čerpadel (popř. gradientového mixeru), detektoru měřícího eluát – vytékající mobilní fázi (spektrofotometr, refraktometr, hmotnostní spektrometr), jímače frakcí a výstupu analyzovaných dat (zapisovač, počítač).

Charakteristickou veličinou pro každou separovanou látku je eluční objem nebo eluční čas, označovaný V_R resp. t_R . Eluční objem představuje celkový proteklý objem mobilní fáze od nanesení rozdělované látky na kolonu po dosažení maximální koncentrace této látky v eluátu. Eluční čas je pak analogicky doba od nástřiku po maximum eluční křivky dané látky. Eluční objem V_R může být ještě dále charakterizován jako součet V_R' tj. skutečný eluční objem a V_M mrtvý objem kolony.

$$V_R = V_R' + V_M$$

Mrtvý objem kolony se dá charakterizovat jako celkový objem, který v koloně zaujímá mobilní fáze. Experimentálně se dá určit tak, že se na kolonu aplikuje inertní látka, která není na koloně zadržována žádnými silami a její eluční objem se pak rovná mrtvému elučnímu objemu (Obr. 3).



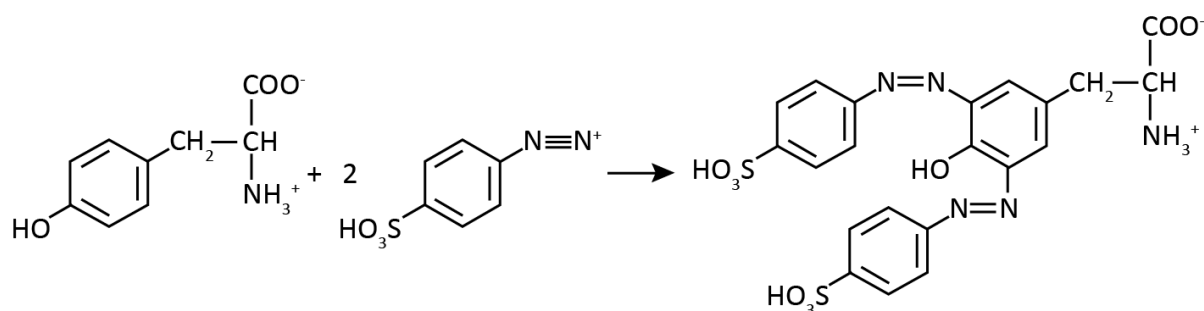
Obr. 3: Eluční profil při sloupcové kapalinové chromatografii. V_M – mrtvý eluční objem, V_{R1} a V_{R2} eluční objemy látek 1 a 2.

1.1.3 Chemické modifikace bílkovin

Modifikace bílkovin patří k důležitým metodám studia jejich struktury. Funkční skupiny vyčnívající z polypeptidického řetězce reagují s běžnými chemickými činidly. Konformační struktura bílkoviny však musí být těmito látkami ovlivněna co nejméně. Modifikace funkčních skupin enzymů vede velmi často ke ztrátě enzymové aktivity zvláště tehdy, je-li modifikovaná funkční skupina poblíž aktivního centra. Při práci se vyhýbáme drastickým postupům vedoucím k denaturaci bílkoviny (extrémní pH, zahřívání, apod.).

Klasickou metodou přípravy "barevných derivátů" bílkovin je metoda značení N-terminálních aminokyselin reakcí s 1-fluor-2,4-dinitrobenzenem. Modifikovanou aminokyselinu je možno detekovat po hydrolýze bílkoviny chromatografickými metodami. Další často užívaná metoda je reakce s 1-dimethylaminonaftalen-5-sulfonylchloridem. Toto činidlo specificky reaguje s aminoskupinami za vzniku fluoreskujícího derivátu, který je snadno detekovatelný. Fluoreskující derivát bílkoviny se využívá při imunologických studiích nebo při chromatografických metodách. Na základě značeného derivátu bílkoviny, který je substrátem proteolytických enzymů, lze stanovit jejich aktivitu. Nezareagovaná bílkovina se vysráží deproteinačním činidlem a v roztoku se stanovují uvolněné barevné produkty hydrolýzy. Fluoreskující funkční skupiny mohou být velmi citlivým indikátorem konformačních změn enzymu, ke kterým může docházet při interakci se substráty nebo inhibitory.

Jedním z nejjednodušších postupů přípravy značeného derivátu bílkoviny je kopulace s diazoniovou solí. Aromatické jádro tyrosinu nebo imidazolové jádro histidinu reaguje s diazotovanou kyselinou sulfanilovou, *p*-aminobenzoovou nebo různými diazotovaným aromatickými či heterocyklickými aminy (princip Paulyho reakce) (Obr. 3). Kopulaci, která probíhá v alkalickém prostředí, je nutno provádět v pufru při konstantním pH, aby denaturace bílkoviny byla co nejmenší.



Obr. 3 Kopulace s diazoniovou solí (Paulyho reakce).

1.2 Praktická část

1.2.1 Gelová chromatografie barevného derivátu albuminu

1.2.1.1 Vybavení

1.2.1.1.1 Přístroje

- Elektromagnetická míchačka, spektrofotometr.

1.2.1.1.2 Chemikálie

- Tetraboritan sodný, kyselina sulfanilová, uhličitan sodný, dusitan sodný, kyselina chlorovodíková, albumin, Sephadex G-25.

1.2.1.1.3 Roztoky

- **0,3 M kyselina sulfanilová v 0,1% uhličitanu sodném**
5,20 g kyseliny sulfanilové se rozpustí v 0,1% uhličitanu sodném a poté doplní do objemu 100 ml.
- **0,1% uhličitan sodný**
0,1 g uhličitanu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml.
- **1 M dusitan sodný**
6,9 g dusitanu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na objem 500 ml.
- **0,2 M kyselina chlorovodíková**
17,2 ml HCl se doplní vodou do 1000 ml.
- **5% albumin v 0,05 M uhličitanoborátovém pufru pH 10**
5 g albuminu se rozpustí v uhličitanoborátovém pufru a doplní na objem 100 ml.
- **0,05 M uhličitanoborátový pufr pH 10**
0,53 g uhličitanu sodného se rozpustí ve vodě a upraví se objem na 100 ml.
0,955 g tetraboritanu sodného se rozpustí ve vodě a objem se upraví na 50 ml.
75,4 ml 0,05 M uhličitanu sodného se smíchá s 24,6 ml 0,05 M tetraboritanu sodného.

1.2.1.2 Postup

Příprava barevného derivátu bílkoviny (azoderivát albuminu připravený kopulací s diazotovanou kyselinou sulfanilovou)

1. 5 ml kádinku vložte do ledové lázně v plastové misce a míchejte na elektromagnetické míchačce.
2. Do kádinky napipetujte 0,7 ml 0,3 M kyseliny sulfanilové.
3. Po vychlazení roztoku přidejte 0,15 ml 1 M dusitanu sodného.

Nesmí vzniknout sraženina. Pokud sraženina vznikne, musí se roztok připravit znovu (sraženina by ucpala kolonu).

4. Nakonec přidejte 0,925 ml 0,2 M kyseliny chlorovodíkové.
5. Po několika minutách roztok vzniklé diazoniové soli odstavte z ledu a z míchačky.

6. Vlastní kopulaci diazoniové soli s bílkovinou proveďte za pokojové teploty. Do čisté 5 ml kádinky napipetujte 1,25 ml 5% albuminu v uhličitanoborátovém pufru.
7. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce přidávejte po kapkách 1 ml připravené diazoniové soli. Při správné přípravě má vzniknout jasně oranžový roztok.
8. Směs ještě cca 1 min míchejte na míchačce a poté ji ponechte při pokojové teplotě 30 minut stát.
9. Oddělte vedlejší produkty kopulace od značeného derivátu bílkoviny gelovou chromatografií.

Gelová chromatografie (oddělení vedlejších autokopulačních produktů kyseliny sulfanilové od albuminu gelovou chromatografií)

1. Pod kolonu umístěte kádinku, do které bude voda odkapávat. Povolte kohout, kterým je uzavřen průtok vody v koloně, zapněte peristaltickou pumpu. Kolonu nechejte 20 min promývat vodou. Během chromatografie hlídejte zásobník s vodou, aby v něm bylo vždy dostatek vody, vyhněte se tím nechtěnému vyschnutí kolony!
2. Když je kolona dostatečně promytá vodou, zavřete kohout kolony, vypněte peristaltickou pumpu.
3. Z kolony obsahující Sephadex G-25 opatrně odstraňte zátku a pootevřením kohoutu nechejte odkapat vodu (mobilní fázi) nad povrchem gelu. Jakmile hladina vody dosáhne úrovně gelového sloupce, kohout uzavřete. **Pozor, gel nesmí vyschnout!**
4. Pod ústí kolony vložte 25 ml odměrný válec.
5. Na povrch gelu v koloně velmi opatrně a pomalu napipetujte 1 ml analyzovaného roztoku kopulačních produktů.
6. Pootevřením kohoutu nechejte roztok vsáknout do gelu, poté kohout opět uzavřete.
7. Čistou špičkou naneste na povrch gelu cca 2 ml destilované vody, kterou nechejte vsáknout.
8. Nanesení destilované vody opakujte 2 x.
9. Při třetím nanesení destilované vody, kohout kolony otevřete až po napojení kolony na zásobní rezervoár mobilní fáze.
10. Sledujete pohyb jednotlivých barevných pásů na koloně.
11. Dle pokynů vedoucího cvičení začněte jímat do předem připravených kalibrovaných mikrozkuvek frakce po 1,5 ml.
12. Jakmile z kolony vytéká pouze čistá voda, pokus ukončíte (upřesní vyučující, cca 35 mikrozkuvek).
13. Po ukončení chromatografie nechte kolonu ještě 20 min promývat vodou. Zapište si mrtvý objem kolony V_m (objem vody v odměrném válci).
14. U jednotlivých frakcí změřte na spektrofotometrickém readru absorbanci při 420 nm proti destilované vodě.

Spektrofotometrické stanovení směsi kopulačních produktů

1. Do mikrodestičky napipetujte 250 μ l z každého vzorku v duplikátu. Jako blank napipetujte vodu.
2. Spusťte počítač, po plném spuštění Windows zapněte i readr.
3. Reader se ovládá programem i-Control 1.12
4. Po spuštění programu, zvolte možnost přednastaveného protokolu pro měření směsi kopulačních produktů
5. Další nastavení readru a měření destičky provádějte ve spolupráci s vedoucím cvičení
6. Po skončení měření vypláchněte jamky destičky vodou a všechny zbytky kapaliny vyklepeme z destičky do ubrousku.

1.2.1.3 Vyhodnocení

- Do tabulky запиšte eluční objem (připočítejte objem jednorázově odpuštěné vody na počátku pokusu) a absorbanci jednotlivých frakcí.

Zkumavka	V_e (ml)	$V_e + V_m$ (ml)	A_{420}
1	1,5	16,5	
2	3	18	
3	4,5		
4	5		

V_e – eluční objem, V_m – mrtvý objem

- Zakreslete eluční profil dělení směsi kopulačních produktů (závislost absorpance na elučním objemu).
- V grafu označte píky odpovídající eluovanému barevnému derivátu albuminu a nízkomolekulárním produktům.

1.2.1.4 Možné problémy

- Pokud roztok připraveného produktu (barevný derivát albuminu) nemá výrazně syté červené zbarvení a naopak je žlutý, došlo při jeho přípravě k chybě a je nutné celý proces zopakovat. Možnou příčinou je nedostatečné chlazení, případně nevhodné pH.
- Je nutné stále sledovat množství mobilní fáze nad sorbentem v koloně případně vzorku při nanášení na kolonu. Hrozí vyschnutí a zničení gelové matrice. Pokud dojde k vyschnutí kolony, je nutné ji znovu přeplnit.
- Objem mobilní fáze, který je jímaný do válce (mrtvý objem kolony) upřesní vyučující. Objem je závislý na typu a stavu kolony.
- Vyučující na začátku cvičení rovněž upřesní, zda se budou dále jímat vzorky po 1,5 ml, případně v jiném objemu.
- Při vkládání kyvety do spektrofotometru je nutné dávat pozor, kudy prochází paprsek (kyvetu vložit ve správném směru).

2 Restrikce a elektroforéza

2.1 Teoretický úvod

2.1.1 Restrikce

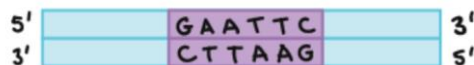
Restrikce je jednou ze základních metod molekulární biologie. Slouží pro rozštěpení DNA vláknů na různě dlouhé fragmenty. Na základě rozdílné velikosti fragmentů je založena celá řada detekčních metod, včetně těch využívaných v lékařské diagnostice. Genové inženýrství využívá restrikce k vyjmutí požadovaného úseku DNA za účelem jeho vnesení do cílového organismu a vedoucí ke změně jeho vlastností.

Restrikční enzymy

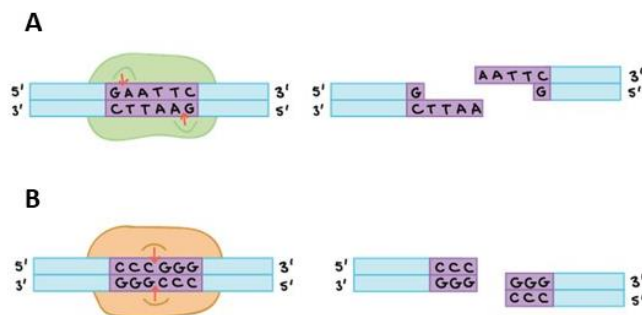
K vyjmutí požadovaného úseku DNA, která představuje gen našeho zájmu, se využívá enzymů, které se nazývají **restrikční endonukleasy** (restriktasy, EC 3.1.21.X). Restrikční endonukleasy rozpoznávají specifické sekvence DNA, které bývají tvořeny čtyřmi až osmi nukleotidovými páry – tyto sekvence bývají často **palindromatické (komplementárně osově symetrické)**, tzn., že ve směru 5'→3' jednoho vlákna DNA se vyskytuje úplně stejná sekvence ve směru 5'→3' komplementárního vlákna (Obr. 4). Restrikční endonukleasy mohou být i méně specifické, v takovém případě rozeznávají například určitý počet po sobě následujících jakýchkoli purinových nukleotidů apod.

Sekvence rozpoznávaná konkrétní restrikční endonukleasou se v různých molekulách DNA (např. různých jedinců stejného druhu) vyskytuje s různou četností. Díky rozdílné frekvenci výskytu daného restrikčního místa tak můžeme rozlišit různé sekvence (jednotlivce) mezi sebou. To je podstatou metody zvané DNA Fingerprinting, která je využívána například při určování otcovství či ve forenzní genetice.

DNA může být restrikčními endonukleasami štěpena za vzniku **tupých** nebo **lepivých konců**, čehož bývá využíváno při spojování fragmentu DNA insertu s fragmentem DNA vektoru, které vznikly štěpením stejnými endonukleasami, za použití enzymu ligasy. Lepivý konec je takový, který obsahuje na jedné straně přesah nukleotidové sekvence, tupý konec tento přesah postrádá (Obr. 5).

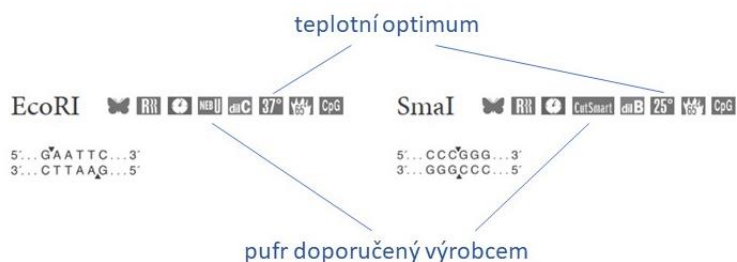


Obr. 4 Palindromatická sekvence DNA rozpoznávaná enzymem *EcoRI*.



Obr. 5 Dvě variace konců vznikajících při štěpení restrikními endonukleasami. A – lepivý konec vznikající štěpením DNA pomocí enzymu *EcoRI*; B – tupý konec vznikající štěpením DNA pomocí enzymu *SmaI*.

Restrikní endonukleasy jsou komerčně dostupné od různých výrobců (např. Obr. 6). Jako každý enzym, má každá jednotlivá restrikní endonukleasa své teplotní a pH optimum, které je třeba během reakce dodržet pro její optimální průběh. Restriktasy bývají dodávány s vhodným pufrům, který pH optimum reakce zajistí, pak už je jen třeba dát pozor na teplotu reakce.



Obr. 6 Enzymy *EcoRI* a *SmaI* firmy New Engalnd BioLabs.

Názvosloví restrikních endonukleas

Název restrikní endonukleasy je odvozen od názvu organismu, ze kterého daná restriktasa pochází. Například enzymy s názvem počínajícím na písmena *Eco* jsou izolovány z bakterií *Escherichia coli*. Příklady restrikních endonukleas najdete v Tab. 1. Červené šipky znázorňují místo štěpení restrikní endonukleasou.

Tab. 1: Příklady restrikních endonukleas.

Název enzymu	Organismus původu	Restrikní místo
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'-GVAATTC-3' 3'-CTTAAAG-5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'-GVGATCC-3' 3'-CCTAGAG-5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'-AVAGCTT-3' 3'-TTCGA^A-5'
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	5'-CCC^VGGG-3' 3'-GGG^AGCC-5'
<i>SacI</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>	5'-GAGCTVC-3' 3'-C^ATCGAG-5'

2.1.2 Agarosová elektroforéza

V současnosti se biochemický, molekulárně biologický a biotechnologický výzkum neobejde bez velmi často používané separační metody – elektroforézy. Jedná se o elektromigrační metodu, která se využívá k separaci makromolekul na **základě jejich náboje, konformace a velikosti**. Migrace nabité částice v elektrickém poli je ovlivněna interakcí mezi ionty a závisí hlavně na celkovém náboji, velikosti a tvaru částice a na viskozitě prostředí. Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, jelikož nabité částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí.

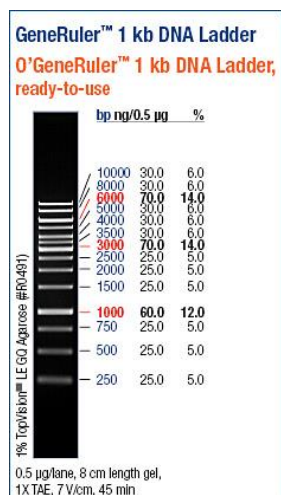
Elektroforéza jako taková spočívá v migraci elektricky nabitých částic v poli **stejnoseměrného proudu**, přičemž toto pole se vytvoří vložením konstantního napětí mezi elektrody elektroforetické komory. Kationty putují ke katodě (záporný pól), anionty naopak k anodě (kladný pól), neutrální částice se nepohybují. V průběhu separace se vytvářejí oddělené zóny na základě odlišné rychlosti migrace složek vzorku.

Nejčastějším typem elektroforézy je elektroforéza gelová. Využívá se k izolaci a analýze nukleových kyselin nebo proteinů. Hlavním nositelem náboje u nukleových kyselin je záporně nabitý fosfátový zbytek, proto se nukleové kyseliny pohybují v poli k anodě. Elektroforéza se provádí za použití vhodně zvoleného nosiče, jako je celulóza nebo polymerní gel.

Elektroforéza nukleových kyselin

Pro analýzu nukleových kyselin se používají agarosové nebo polyakrylamidové gely. U těchto gelů je možné ovlivnit velikost pórů a tím dosáhnout dělení nejen z hlediska elektrické pohyblivosti ale hlavně **na základě velikosti molekuly**. Agarosové gely jsou nejvhodnější pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp do 50 kb, velikost pórů zde určuje koncentrace agarosu v gelu. Polyakrylamidové gely se využívají hlavně pro separaci proteinů, velikost pórů je ovlivněna poměrem akrylamidu a bisakrylamidu. Podle uložení gelu do elektroforetické aparatury rozlišujeme gelovou elektroforézu horizontální (př. agarosová elektroforéza) a elektroforézu vertikální, která může mít deskové uspořádání (př. PAGE, polyakrylamidová gelová elektroforéza) a kapilární.

Během migrace DNA není třeba se zabývat velikostí náboje, protože ten je v molekule **rovnoměrně rozložen** díky fosfátům tvořícím kostru DNA. Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu o neznámé velikosti určíme srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí standardu. Standardem (markerem) jsou nejčastěji směsi fragmentů plasmidové DNA o známých velikostech (Obr. 7).

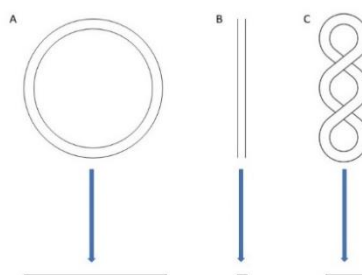


Obr. 7 GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Příklad DNA standardu používaného pro agarosovou elektroforézu firmy ThermoFisher Scientific.

Migrace nukleových kyselin v elektroforéze

Molekula DNA se může vyskytovat v různých konformacích (Obr. 8), které ovlivňují její migraci během elektroforézy. **Kruhová DNA** je oproti stejně velké molekule DNA, která je **lineární**, v agarosovém gelu více zpoždována, jelikož jí gel během separace klade větší odpor – souvisí to s projekcí molekuly DNA kolmo ke směru její migrace v gelu. Některé cirkulární molekuly DNA mohou díky enzymům zvaným topoisomerasy přecházet do tzv. nadšroubovicového vinutí (**superhelikální** konformace DNA). Tyto molekuly potom migrují v gelu pomaleji než stejně velké lineární molekuly, ale rychleji než kruhové molekuly DNA stejné velikosti.

Díky tomuto jevu jsme schopni v gelu rozlišit molekuly plasmidu linearizované restriktivní endonukleasou a plasmidy nelinearizované.

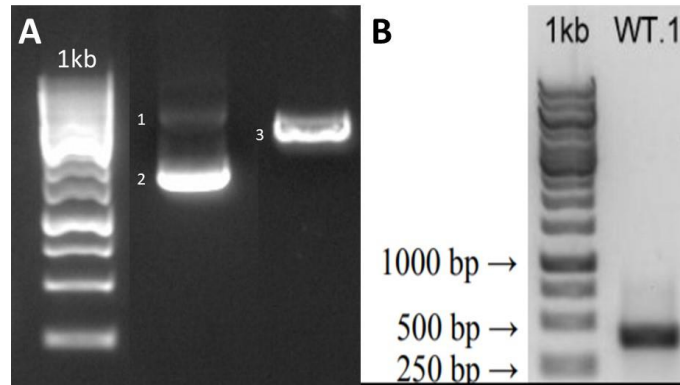


Obr. 8 Různé konformace molekuly DNA a jejich projekce kolmo ke směru migrace během elektroforézy. A – kruhová molekula DNA; B – lineární molekula DNA; C - superhelikální molekula DNA.

Vizualizace DNA v agarosovém gelu

Molekuly DNA nejsou v gelu okem viditelné, proto je třeba je vizualizovat, k tomu se nejčastěji využívá možnost barvení molekul DNA pomocí interkalačních barviv – nejčastěji se používá **ethidium bromid** (Obr. 9), který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA šroubovici. Při ozáření obarveného gelu ultrafialovým světlem se výsledek separace jeví jako proužky, jejichž intenzita zbarvení je potom přímo úměrná koncentraci DNA. Jelikož je

ethidium bromid potenciálně mutagenní, od jeho používání se postupně ustupuje a bývá nahrazen jinými barvivy na stejném principu – např. SybrGreen nebo **GelRed**, se kterým budete pracovat v rámci této úlohy. Molekuly DNA lze značit také radioaktivně, výsledek je pak zaznamenán autoradiograficky.



Obr. 9 Příklad vizualizací agarosových gelů pomocí barviva GelRed (A) a barviva ethidium bromid (B).

(A) Různé konformace plasmidu pUC19.

1kb – 1kb DNA ladder, 1 – cirkulární forma, 2 – superhelikální forma, 3 – lineární forma (plasmid pUC19 linearizovaný restriční endonukleasou *NdeI*)

(B) Potvrzení přítomnosti *rolA2* genu (genu zodpovědného za tvorbu transgenních kořenů) v *Agrobacterium rhizogenes*.

1kb – 1kb DNA ladder, WT – WT *Agrobacterium* bez vneseného plasmidu.

Pro sledování průběhu agarosové elektroforézy se ke vzorku DNA i standardu přidává barvivo, obsažené v tzv. **nanášecím pufru**, které v agarosovém gelu putuje stejným směrem jako DNA. Velmi často se používá směs dvou barviv, u nichž je známá jejich elektroforetická pohyblivost. Jedním tímto barvivem je **bromfenolová modř**, jehož elektroforetická pohyblivost v 1x TAE pufru odpovídá velikosti DNA přibližně 400 bp, dalším je **xylenová violeť**, která odpovídá DNA o velikosti přibližně 4000 bp (Obr. 10). Nedílnou součástí nanášecího pufru je i **glycerol**, který zajistí klesnutí vzorku DNA na dno jamky v gelu.



Obr. 10 Elektroforetická pohyblivost xylenové violeti a bromfenolové modři.

2.2 Praktická část

2.2.1 Restrikční analýza Ri-plasmidu bakterie *Agrobacterium rhizogenes* R15834

2.2.1.1 Vybavení

2.2.1.1.1 Materiál

- Ri-plasmid izolovaný v úloze Izolace plasmidové DNA, restrikční endonukleasa *Bam*HI (5 U/ μ l)

2.2.1.1.2 Přístroje

- vodní lázeň temperovaná na 37 °C

2.2.1.1.3 Chemikálie

- Tris, kyselina chlorovodíková, MgCl₂, KCl, Triton X-100, BSA

2.2.1.1.4 Roztoky

- 5x koncentrovaný pufr pro restrikční endonukleasu *Bam*HI
50mM Tris/HCl, 25mM MgCl₂, 500mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,5 mg/ml BSA

2.2.1.2 Postup

Restrikční analýza Ri-plasmidu z *Agrobacterium rhizogenes* R15834

1. Vedoucí cvičení vám připraví mikrozkušavku obsahující 10 μ l restrikční endonukleasy *Bam*HI a 10 μ l 5x koncentrovaného pufru pro *Bam*HI, tu nechejte rozmrazit na ledu a následně na ledu uchovávejte! Pokud je to nutné, odstřed'te obsah na dno zkumavky pomocí stolní minicentrifugy.
2. Vzorek vaší plasmidové DNA nechejte rozmrznout při pokojové teplotě.
3. Z vámi zjištěné koncentrace vaší plasmidové DNA spočítejte, jaký objem odpovídá obsahu 10 μ g.
4. Do mikrozkušavky s restrikční endonukleasou *Bam*HI a příslušným pufrem napipetujte reakční složky dle následující tabulky (Tab. 2). Objem plasmidové DNA a vody je třeba dopočítat vzhledem ke koncentraci vaší plasmidové DNA. Pokud je vypočítaný objem plasmidové DNA mnohem menší než 1 μ l, po dohodě s vedoucím plasmidovou DNA vhodně nařed'te a výpočet zopakujte.

Tab. 2: Složení reakční směsi

Složka	Koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem	Celkový objem
<i>Bam</i> HI	5 U/ μ l	1 U/ μ l	10 μ l	50 μ l
Pufr pro <i>Bam</i> HI	5x	1x	10 μ l	
Plasmidová DNA		10 μ g		
Sterilní voda	-	-	do objemu 50 μ l	

5. Mikrozkumavku opatrně promíchejte pipetováním a dejte inkubovat do vodní lázně temperované na 37 °C na dobu minimálně 1 hod.

2.2.2 Agarosová elektroforéza

2.2.2.1 Vybavení

2.2.2.1.1 Materiál

Vzorky pro agarosovou elektroforézu budou následující:

- Ri-plasmid izolovaný v úloze Izolace plasmidové DNA
- Ri-plasmid izolovaný v úloze Izolace plasmidové DNA a štěpený restriční endonukleasou *Bam*HI

Standard:

- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

2.2.2.1.2 Přístroje

- Mikrovlnka, aparatura pro agarosovou elektroforézu, zdroj konstantního napětí, UV transiluminátor.

2.2.2.1.3 Chemikálie

- Tris, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), bromfenolová modř, xylenová violet, glycerol, agarosa, interkalační barvivo GelRed.

2.2.2.1.4 Roztoky

- **1x TAE pufr**
70mM Tris/CH₃COOH, 1mM EDTA (pH = 8,0)
- **6x koncentrovaný nanášecí pufr**
0,05% (w/v) bromfenolová modř, 0,05% (w/v) xylenová violet, 33% (v/v) glycerol.

2.2.2.2 Postup

Agarosová elektroforéza

Během přípravy a manipulace s agarosovým gelem používejte rukavice!!!

1. Vypočítejte navážku agarosy potřebné pro přípravu 30 ml 0,8% (w/v) agarosového gelu.
2. Vypočítejte objem 50x koncentrovaného TAE pufru pro přípravu 400 ml 1x koncentrovaného TAE pufru.
3. Sestavte komůrku pro agarosový gel. Nachystejte si hřebínek pro tvorbu jamek na vzorky.
4. Do 50 ml Erlenmeyerovy baňky přeneste vypočtenou hmotnost agarosy, přilijte 30 ml 1x TAE pufru.
5. Agarosu rozpustěte v mikrovlnce. Během rozpouštění ohřev velmi často vypínejte a roztok agarosy krouživým pohybem baňky promíchejte. Roztok agarosy velmi rychle přechází do stavu varu a mohlo by dojít ke vzkypění. Pozor, roztok je velmi horký,

používejte kuchyňskou rukavici!!!

6. Vedoucí cvičení do roztoku agarosy přidá barvivo GelRed. Krouživým pohybem baňky promíchejte roztok agarosy s barvivem.
7. Roztok agarosy nalijte do připravené komůrky, odstraňte případné bubliny, vložte hřebínek a nechte gel volně tuhnout po dobu 20-30 min.
8. Komůrku s gelem vložte do elektroforetické aparatury, do aparatury nalijte 1x TAE pufr po rysku označující maximální hladinu, opatrně odstraňte hřebínek. V této fázi je třeba si uvědomit, jakým směrem bude DNA putovat!
9. Do první jamky naneste standard, do dalších jamek naneste vzorky – zapište si jejich pořadí. Během nanášení dejte pozor, abyste špičkou pipety nepropíchlí jamku. Standard i vzorky vypouštějte ze špičky pomalu, abyste předešli jejich vztlínání do sousedních jamek.
10. Aparaturu uzavřete víkem. Zkontrolujte orientaci elektrod – opět je třeba si uvědomit, kterým směrem DNA bude putovat.
11. Připojte aparaturu ke zdroji napětí. Nastavte hodnotu konstantního napětí 80 V. Elektroforézu nechte proběhnout přibližně 60 min. Kontrolujte její průběh sledováním migrace barviv.
12. Vypněte zdroj napětí, otevřete aparaturu a agarosový gel opatrně přeneste na desku UV transiluminátoru. Zavřete víko UV transiluminátoru, zapněte UV lampu a gel si vyfoťte.

2.2.2.3 Vyhodnocení:

- Do protokolu zahrňte fotografii agarosového gelu, popište jej. Odečtěte přibližnou velikost vizualizovaných fragmentů. Diskutujte přítomnosti dalších fragmentů u neštěpeného plasmidu pUC19.