UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH

POKROČILÉ PRAKTIKUM Z BIOCHÉMIE A MOLEKULOVEJ BIOLÓGIE

Viktor Víglaský,
Petra Krafčíková, Erika Demkovičová

Prírodovedecká fakulta

Košice 2017

Vysokoškolské učebné texty - Univerzita Pavla Jozefa Šafárika

Prírodovedecká fakulta

Pokročilé praktikum z biochémie a molekulovej biológie

Viktor Víglaský, Petra Krafčíková, Erika Demkovičová

2016

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,
Prírodovedecká fakulta

Pokročilé praktikum z biochémie a molekulovej biológie

Vysokoškolský učebný text

Autori:

doc. RNDr. Viktor Víglaský, PhD.

RNDr. Petra Krafčíková, PhD.

RNDr. Erika Demkovičová

Prírodovedecká fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Vedecký redaktor:

doc. Peter Pristaš, CSc.

Prírodovedecká fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Recenzenti:

doc. RNDr. Peter Javorský, DrSc.

Doc. RNDr. Jozef Uličný, CSc.

© 2017 Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani žiadnu jeho časť nemožno reprodukovať, ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez súhlasu majiteľov práv.
Za odbornú stránku tejto publikáciu zodpovedajú autori.

ISBN 978-80-8152-572-8

Úvod

Učebné texty sú určené pre študentov so zameraním na prírodné vedy v oblasti biochémie a molekulovej biológie, pričom obsahom nadväzujú na prednášky z biochémie, molekulovej biológie alebo biochémie nukleových kyselín a niektorými praktickými úlohami ich dopĺňajú. Po obsahovej stránke je potrebné tento text chápať ako pomocný materiál k praktickým cvičeniam. Ich význam spočíva v tom, že študenti získajú doplnkový študijný materiál, ktorý využijú pri získavaní zručností so základnými laboratórnymi technikami tvorby, prenosu, identifikácie, izolácie a analýzy plazmidovej rekombinantnej DNA a spektrálnej analýzy makromolekulových systémov, pritom si časť svojich teoretických vedomostí, získaných počas prednášok, sami prakticky vyskúšajú na vybraných laboratórnych úlohách. Zároveň sa oboznámia s mechanizmami a významom jednotlivých čiastkových krokov v predložených protokoloch, ktoré sú väčšinou zamerané na najčastejšie používaný objekt klonovania, na bakteriálne bunky *Escherichia coli*.

Techniky molekulového klonovania sa zdajú byt' relatívne jednoduché, ale väčšina protokolov zahrňuje množstvo individuálnych krokov, ktoré môžu experimentátorovi bez predchádzajúcich skúseností spôsobiť nemalé ťažkosti, čo sa obyčajne prejavuje na kvalite a kvantite výsledného produktu. Je preto veľmi dôležité, aby sa každý medziprodukt pri manipuláciách s DNA pri jednotlivých krokoch protokolu kontroloval s definovaným štandardom.

Z množstva literatúry, v ktorej sa môžeme oboznámiť s technikami konštrukcie a analýzy rekombinantnej DNA vyplýva, že postupy používané pri tvorbe rekombinantnej DNA v molekulovom klonovaní a sekvenovaní nukleových kyselín sa neustále modernizujú a ďalej vyvíjajú, avšak ich základná podstata a princípy sa nemenia. Mnohé z nich sa prispôsobujú potrebám jednotlivých laboratórií, sú modifikované samotnými experimentátormi, prípadne sa na základe praktických skúsenosti zjednodušujú. Obsah týchto úloh zahrňuje vybrané základné postupy odvodené od základných protokolov pôvodnej príručky „Molecular cloning“ od autorov Sambrooka a Russela [Sambrook a Russell 2001]. Čiastočné modifikácie týchto postupov sú doplnené o praktické skúsenosti získané v našich biochemických laboratóriách na Katedre biochémie Prírodovedeckej fakulty UPJŠ v Košiciach. Jednotlivé návody je potrebné chápať ako čiastkové operácie a nie ako popis práce pri riešení jednotlivých praktických úloh.

Vybrané techniky rekombinantnej DNA v týchto praktických úlohách by mali poslúžiť ako základná metodická orientácia pre začiatočníkov. Dúfame, že precvičenie uvedených pracovných postupov prispeje k vytvoreniu reálnejšej predstavy o metódach používaných hlavne v molekulovej biológii pre vysokoškolských študentov a vzbudí ich záujem o hlbšie štúdium metód génového inžinierstva.

Tento študijný materiál vznikol aj vďaka podpore projektov KEGA - 002UPJŠ-4/2015 „Inovácia obsahu, foriem a metód praktických cvičení z anorganickej, organickej a analytickej chémie a biochémie pre zvýšenie uplatniteľnosti absolventov v praxi“ a APVV- 0280-11.

Kolektív autorov

Obsah

Úvod **2**

1 Základy manipulácie s genetickým materiálom **6**

1.1 Bakteriálna kultivácia 7

1.1.1 Bakteriálna kultivácia v tekutých médiách – rastová krivka 8

1.1.2 Kultivácia na tuhých agarových médiách 11

1.2 Izolácia nukleových kyselín 13

1.2.1 Základné princípy izolácie bakteriálnej DNA 15

1.2.2 Postup izolácie chromozomálnej DNA z buniek *Streptococcus bovis* 16

1.3 Princípy izolácie RNA molekúl 20

1.4 Fragmentácia DNA 21

1.5 Ligácia DNA 23

1.6. Príprava kompetentných buniek a transformácia DNA 24

1.5 Úlohy 25

1.5.1 Príprava LB média a očkovanie 25

1.5.2 Meranie rýchlosti rastu bakteriálnych kultúr 25

1.5.3 Izolácia plazmidovej DNA pomocou alkalickej lýzy 26

1.5.4 Izolácia plazmidovej DNA lýzou indukovanou varom 27

1.5.5 Fragmentácia DNA 28

1.5.6 Príprava kompetentných buniek a transformácia 29

1.5.7 Kultivácia na tuhých médiách 29

2 Polymerázová reťazová reakcia (PCR) **31**

2.1. Základné podmienky prípravy reakčného roztoku PCR 31

2.2 Návrh primérov 32

2.3 Popis reakčných krokov pri PCR 33

2.4 Analýza produktov PCR 34

2.5 Praktické využitie PCR 34

2.5.1 PCR analýza STR oblastí na určenie príbuzenstva 34

2.5.2 PCR detekcia ľudského papilomavírusu (HPV) 35

2.6 Úlohy 37

2.6.1 PCR reakcia inhibovaná ligandom 37

2.6.2 Využitie PCR na určenie príbuzenstva resp. detekciu HPV 37

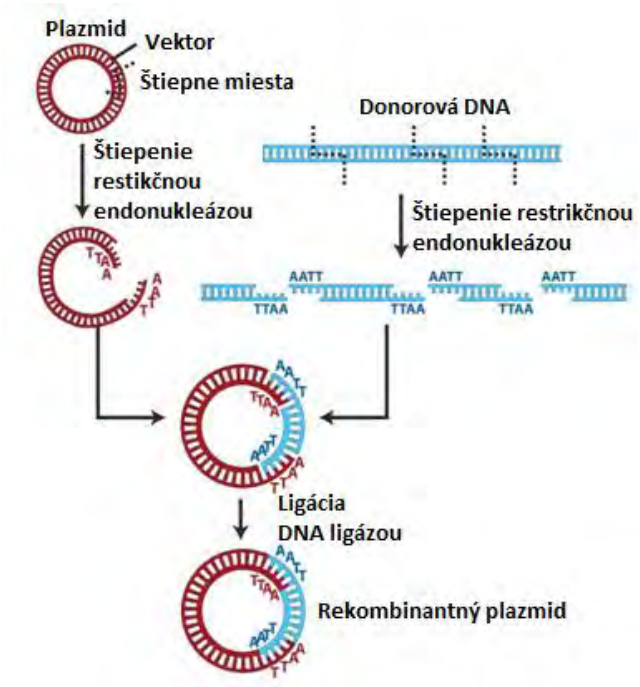
2.6.3 Elektroforetická analýza PCR produktov ... 39
3 Elektroforetické metódy ... 40
3.1 Faktory ovplyvňujúce elektrickú pohyblivosť ... 44
3.2 Náboj koloidných častíc a nanočastíc ... 46
3.3 Papierová elektroforéza ... 47
3.4 Elektroforéza na acetylcelulóze ... 48
3.5 Elektroforéza v škrobovom géle ... 49
3.6 Elektroforéza v agarózovom géle ... 49
3.7 Polyakrylamidová gélová elektroforéza - PAGE ... 52
3.8 Najčastejšie používané typy PAGE ... 54
3.9 Určenie relatívnych molekulových hmotností pomocou SDS a koncentračnej gradientovej PAGE ... 58
3.10 Teplotná gradientová gélová elektroforéza ... 61
3.10.1 Štúdium konformačnej stability makromolekúl teplotnou gradientovou gélovou elektroforézou ... 63
3.10.1 Biofyzikálny princíp teplotnej a denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy ... 63
3.10.3 Obrazová analýza elektroforetických záznamov ... 67
4 Spektrálne metódy ... 69
4.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA ... 69
4.1.1 Úloha ... 70
4.2 Interakcie nízkomolekulových ligandov s nukleovými kyselinami ... 71
4.2.1 UV-Vis spektroskopia ... 71
4.2.2 Štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi prostredníctvom UV-Vis spektroskopie ... 72
4.2.3. Úlohy k titračnej analýze ... 74
4.2.4. Spektroskopická analýza denaturačného profilu vybraného proteínu alebo nukleovej kyseliny pomocou detergenčných činidiel ... 75
4.2.5 Úlohy ... 76
4.3. CD spektroskopia ... 77
4.3.3. Štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi pomocou CD spektroskopie ... 78

4.3.1 Úlohy 80
4.4. Fluorescenčná spektroskopia 81
4.4.1 Štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi prostredníctvom fluorescenčnej spektroskopie 83
4.4.2 Úlohy 84
5 Vplyv *cis* a *trans* platinových derivátov na štruktúru DNA molekúl 85
5.2 Určenie odvíjaceho uhla platinových derivátov 86
5.2.1 Úloha 87
6 Extrakcia histónov z jadier pečene 88
6.1 Princíp izolácie histónov 90
6.2 Pracovný postup 91
6.1.1 Úlohy 93
7 Použitá literatúra 94

1 Základy manipulácie s genetickým materiálom

Všetky živé organizmy sú tvorené autonómnymi živými systémami – bunkami, tvorenými širokou škálou molekúl. Štúdium biomolekúl poskytlo základ pre vznik molekulovej biológie ako vednej disciplíny. Pokroky, ktoré toto odvetvie prinieslo vyústili v 70-tych rokoch 20. storočia do vývoja nových techník, ktoré umožnili manipuláciu s genetickým materiálom a inkorporovanie ho do hostiteľského organizmu. Nový rekombinantný, alebo tiež známy ako geneticky modifikovaný organizmus (GMO), získava nové vlastnosti na základe požiadaviek experimentátorov. Využívanie týchto techník vyústilo do vzniku nového samostatného vedného odboru označovaného ako génové inžinierstvo.

Génové inžinierstvo je súbor metodologických postupov vedúcich ku vzniku rekombinantného organizmu, ktoré v základoch využívajú metódy špecifického štiepenia DNA molekúl v miestach, kde bude vložený cudzorodý fragment DNA. K tomuto účelu sa často využívajú vektorové plazmidové formy DNA molekúl. Takto pripravená DNA sa nazýva **rekombinantná DNA**. V prípade ak je rekombinantná DNA použitá na transformáciu do hostiteľskej bunky a v prípade proliferácie týchto rekombinantných organizmov z jednej bunky, hovoríme o **klonovaní DNA.** Inou možnosťou amplifikácie kratších úsekov DNA (0.1 - 5kb) je možná pomocou metódy nazývanej **polymerázová reťazová reakcia (PCR)**.



Obr. 1. Základný princíp prípravy rekombinantných plazmidov.

Klonovací vektor je zvyčajne dvojvláknová molekula DNA, ktorá sa môže reprodukovať v hostiteľských bunkách a vkladá sa do nej rekombinantná DNA. Najbežnejšie sa ako vektor využívajú **plazmidy** [Viglaský a kol. 2000, Sambrook a Russell 2001]. Bakteriálne plazmidy sú malé kruhové dvojvláknové molekuly DNA, ktorých prirodzenou funkciou je poskytovať bunke napr. rezistenciu na antibiotiká a prežitie v nevhodnom prostredí. Sekvencia mnohých plazmidov bežne používaných ako vektorové molekuly je známa, preto je možné pre ďalšiu manipuláciu využívať restrikčné endonukleázy, ktoré sú považované za špecifické „nožnice“ v molekulovej biológii. V bakteriálnej bunke sa vyskytujú jednotlivo alebo v mnohých kópiách a ich replikácia je nezávislá od replikácie bakteriálneho chromozómu. Plazmidy sú oveľa menšie ako chromozomálna DNA, a preto sa dajú pomerne jednoducho separovať od chromozomálnej DNA [Rothman 2014].

1.1 Bakteriálna kultivácia

Bakteriálne kultúry môžeme pripraviť kultiváciou v tekutých médiách alebo na tuhých platniach. Kultivačné médiá pripravujeme rozpustením jednotlivých zložiek alebo zmesi v požadovanej koncentrácii vo vode. Následne je médium sterilizované v autokláve po dobu 15-20 minút. Po ochladení sú do roztoku pridané baktérie z tzv. inokula. **Inokulum** je suspenzia baktérií alebo vírusov v médiu, ktorá slúži ako zásobný roztok na prenos na živnú pôdu. Obvykle je do nich pridávaný glycerol zabraňujúci popraskaniu bunkových stien, vďaka čomu môžu byť tieto kultúry uchovávané pri nízkych teplotách od -20 až -190 °C po dobu aj niekoľkých rokov. Najčastejšie sa na štandardné experimenty používajú v našich laboratóriách bakteriálne kmene *E. coli* Top 10 a Dh5α.

Luria-Bertani médium (tzv. **LB** médium) je nutrične bohaté médium, ktoré je primárne používané pre rast baktérií. Ako štandard sa používa pre kultiváciu *E. coli* od 50-tych rokov 20-tého storočia. Tieto médiá sú široko používané v molekulovej biológii pri príprave plazmidovej DNA a rekombinantných proteínov. Existuje niekoľko bežne používaných zmesí LB, ktoré majú vo všeobecnosti podobnú kompozíciu zložiek používaných na podporu rastu buniek. Všetky zmesi musia obsahovať: peptidy a kazeínové peptóny, vitamíny (vrátane vitamínov B), stopové prvky a minerály (dusík, síra, horčík). Peptidy a peptóny (tryptóny) sú väčšinou produkované z

kazeínového hydrolyzátu, vitamíny a niektoré stopové prvky sa nachádzajú v extraktoch z kvasiniek. Pre mnohé bakteriálne kultúry je nevyhnutné pridávať do kultivačných médií aj ióny sodíka, prípadne iné soli, ktoré sú nevyhnutné pre transport a osmotickú rovnováhu. Komerčne dodávaný bacto-tryptón obsahuje aj esenciálne aminokyseliny, ktoré sú nevyhnutné pre rast baktérií, kým bacto-yeast (kvasinkový) extrakt sa používa na zabezpečenie prítomnosti veľkého množstva organických zlúčenín napomáhajúcich bakteriálnemu rastu.

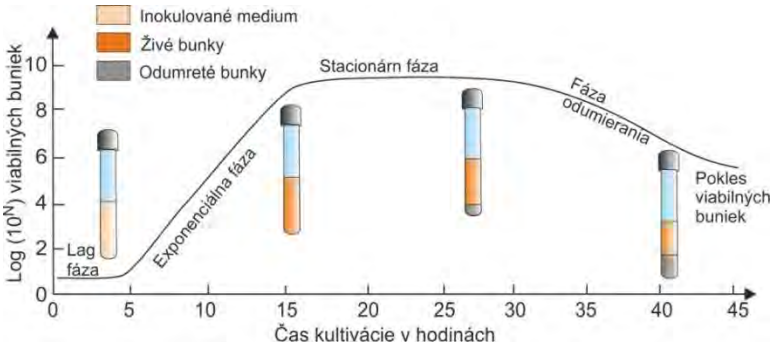
Tekuté médiá sa môžu pripraviť a uchovávať aj niekoľkonásobne skoncentrované. Pred použitím je potrebné ich rozriediť v sterilnej destilovanej vode. Uzavreté a sterilné médiá sa môžu skladovať v chladničke dlhodobo, kratšie pri laboratórnej teplote. Po naočkovaní bakteriálnej kultúry sa médiá inkubujú obyčajne pri fyziologickej teplote 37°C a ich prevzdušňovanie je zabezpečené intenzívnym miešaním. Objem kultivačnej nádoby by mal byť aspoň štyrikrát väčší ako je objem samotného média.

Mikrobiologické laboratórne techniky, ktoré sú nevyhnutné pri molekulovom klonovaní sú v svojej podstate jednoduché a pri dodržiavaní základných zásad práce so sterilnými materiálmi sa dosahujú reprodukovateľné výsledky. Bakteriálne bunky je možné kultivovať v tekutých alebo na tuhých rastových médiách.

1.1.1 Bakteriálna kultivácia v tekutých médiách – rastová krivka

Rýchlosť rastu bakteriálnej kultúry všeobecne závisí od niekoľkých faktorov: zloženie kultivačného média, genotyp bakteriálneho kmeňa, teplota kultivácie a stupeň prevzdušňovania kultivačného média. Počas statickej kultivácie hustota bakteriálnych buniek stúpa dovtedy, kým koncentrácia buniek nedosiahne určitý stupeň nasýtenia. Pri nasýtení dochádza k zníženiu rýchlosti delenia bakteriálnych buniek, pri ktorom ale ešte stále nedochádza k strate vitality. Pri statickej kultivácii rastú baktérie v prostredí, ktorého vlastnosti a zloženie sa menia v závislosti na biologickej činnosti bakteriálnych buniek, pričom množenie buniek nemá trvalo vzostupnú tendenciu ale prebieha v charakteristických fázach vzostupu a poklesu, tzv. rastová krivka (Obr. 2). Všetky bunky a ich metabolické produkty, zostávajú počas celej doby kultivácie v izolovanom prostredí, preto je tento systém považovaný za uzavretý. Faktory limitujúce rast sú tu podmienené predovšetkým zmenami prostredia indukovaný samotnými baktériami. Rast baktérií spôsobuje predovšetkým vyčerpanie živín a hromadenie odpadných produktov. Rýchlosť rastu tekutej bakteriálnej kultúry je najvhodnejšie

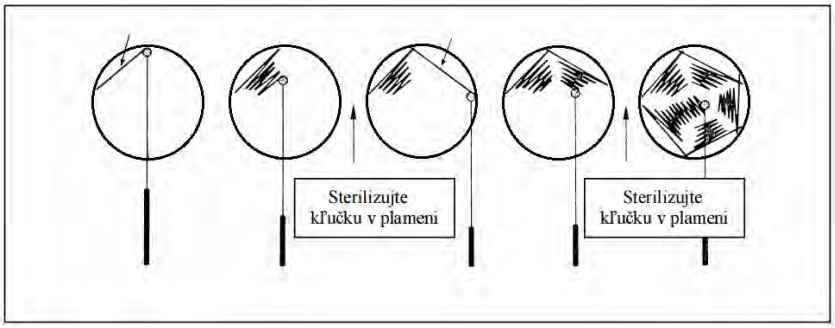
sledovať odoberaním alikvotného množstva kultúry v pravidelných intervaloch počas kultivácie a meraním jeho optickej hustoty (optical density, OD_{600}) pri vlnovej dĺžke 600 nm, pre presné merania sa však vyžaduje stanovenie počtov vitálnych buniek odpovedajúcich nameranej hodnote OD_{600}. Množstvo buniek v bakteriálnej kultúre sa stanovuje vysiatím presného objemu vzorky získanej desatinným riedením pôvodnej bakteriálnej kultúry na agarové platne.



Obr. 2. Rastová krivka baktérii v kultivačnom médiu: fáza prispôsobovania sa je súčasťou tzv. lag fázy, fáza exponenciálneho rastu, fáza stacionárna a spomaleného rastu a fáza odumierania buniek alebo neskorá stacionárna fáza, kde dochádza k poklesu tzn. odumieraniu. Logaritmus počtu buniek na mL kultivačného média môže byt' nahradený tzv. optickou hustotou bakteriálnej kultúry (OD).

Počet bakteriálnych buniek na mL pôvodného kultivačného média sa potom stanoví na základe množstva jednotlivých bakteriálnych kolónií získaných pri najnižšom riedení. Monitorovaním rastu bakteriálnych buniek pomocou OD_{600} môžeme získať rastovú krivku, ktorá nám poskytuje údaje o fyziologickom stave daného bakteriálneho kmeňa v závislosti na čase. Získané údaje sú využiteľné napríklad pri príprave kompetentných buniek, pri stanovení produkcie biologicky aktívnych látok, enzýmov, sekundárnych metabolitov a pri sledovaní bakteriostatického alebo bakteriocidného účinku rôznych látok. Prevzdušňovanie bakteriálnej kultúry počas rastu v kultivačnej nádobe najlepšie zabezpečíme intenzívnym pretrepávaním kultivačného média, pričom objem kultivačnej nádoby by mal byt' minimálne štyrikrát väčší ako je objem média. Kultivačné médiá sa pripravujú navážením jednotlivých zložiek LB média v práškovej forme. Po rozpustení všetkých komponentov vo vode a úprave hodnoty pH (obyčajne na pH 8) sa médium sterilizuje pri teplote 115 až 120°C v sterilizačnom autokláve alebo tlakovej nádobe počas 15-20 minút. Médium môže obsahovať okrem základných

komponentov aj zložky nevyhnutné pre propagáciu genotypových vlastností kultivovaného bakteriálneho kmeňa (napr. antibiotiká). Niektoré komponenty je vhodné sterilizovať samostatne (filtráciou alebo autoklavovaním), do kultivačného média sa pridávajú až po jeho ochladení na 45-50°C (napr. glukóza, sacharóza, antibiotiká, $MgCl_2$, $CaCl_2$), prípadne priamo pred naočkovaním bakteriálneho kmeňa (tzv. inokuláciou). Sklenené kultivačné nádoby, pipety, skúmavky, Petriho misky a odmerné valce sa obyčajne sterilizujú horúcim vzduchom zabalene do hliníkovej fólie aj 2 hod. pri 180 °C.



Obr. 3. Postup pri nanášaní baktérií pomocou bakteriologickej kľučky. Po každom roztere sa vysterilizuje bakteriologická kľučka plameňom. Opakovaným rozterom a následnou sterilizáciou bakteriologickej kľučky sa dosiahne vyriedenie baktérií až na jednotlivé bunky, ktoré sú základom rastu jednotlivých kolónií [Víglaský a kol. 2000].

V súčasnosti sa vo väčšine laboratórií používajú pipety, skúmavky a Petriho misky z plastov, ktoré sa dodávajú sterilné priamo od výrobcu a sú určené na jedno použitie. Tekuté médiá sa môžu pripraviť čerstvé alebo zo zásobných roztokov, ktoré sú 5-krát koncentrované. Takéto roztoky pred použitím len rozriedime v primeranom objeme sterilnou destilovanou vodou. Uzavreté sterilné médiá možno dlhodobo skladovať v chladničke alebo kratšiu dobu (do 30 dní) aj pri laboratórnej teplote. Po inokulácii rastového média, vytemperovaného na laboratórnu teplotu, bakteriálne bunkové kmene kultivujeme v termostate bez trepania alebo vo vodnej, prípadne v teplovzdušnej trepačke pri 37°C s regulovanou intenzitou trepania. Na inokuláciu sa obyčajne používa nočná bakteriálna kultúra v objeme 1-5 mL z pripravovanej bakteriálnej kultúry alebo jedna kolónia (single colony) z agarovej platne, ktorá sa odoberie so sterilnou bakteriologickou kľučkou. Samostatnú bakteriálnu kolóniu si pripravíme viacnásobným rozterom vzorky na agarovej platni (Obr. 3.) a následnou kultiváciou v termostate. Pre dosiahnutie dobrých kultivačných výsledkov sa doporučuje pripravovať čerstvé tekuté rastové médiá.

Bakteriálne bunky určené na izoláciu DNA získavame z tekutého média centrifugáciou bezprostredne po skončení kultivácie. Bakteriálne pelety môžeme okamžite využiť na požadované účely alebo ich uchovávať v zmrazenom stave až do ďalšieho spracovania.

1.1.2 Kultivácia na tuhých agarových médiách

Tuhé pôdy vhodné na kultiváciu v bakteriologických Petrino miskách obsahujú okrem základných komponentov aj 15 g bacto-agaru na liter média, na prípravu vrchnej agarovej pôdy (tzv. soft agar) sa používa len 7 g/L. Podľa potreby je možné do spodného alebo vrchného agaru pridávať okrem antibiotík aj substráty vhodné na stanovenie expresie rekombinantnej DNA vo forme enzýmovej aktivity v jednotlivých bakteriálnych klonoch (napr. nerozpustný škrob, celulózu alebo xylán) alebo iné substráty vhodné na primárnu selekciu. Jednotlivé komponenty, navážené na pripravovaný objem média sa rozpúšťajú vo vode. Hodnota pH je obyčajne upravená na hodnotu 7,5 hydroxidom sodným. Tento roztok sa sterilizuje v autokláve alebo inej tlakovej nádobe. Po sterilizácii a ochladení na 55°C a po pridaní termolabilných komponentov (napr. antibiotík) sa agarová pôda vylieva priamo z fľaše do sterilných misiek v množstve asi 25-30 mL na misku s priemerom 85 mm, kde sa nechá vychladnúť do stuhnutia agaru. Agarové platne bez antibiotík možno pred použitím uchovávať hore dnom pri laboratórnej teplote 1-3 dni, aby sa odstránila vlhkosť z povrchu platne. Dlhodobo je ich možno uskladňovať v obrátenej polohe v plastovej fólii pri teplote 4 °C v chladničke (antibiotické platne by sa nemali uskladňovať' v chladničke dlhšie ako týždeň). Čerstvo pripravené agarové platne alebo platne z chladničky by sa mali pred použitím čiastočne presušiť a zohriať v termostate na kultivačnú teplotu. Taktiež ich je možné dodatočne vysterilizovať vystavením na UV svetle po dobu najmenej 30 minút. Pozor na presušenie! Petriho misky s agarovými pôdami sa po naočkovaní príslušného bakteriálneho kmeňa pomocou sterilnej bakteriologickej kľučky kultivujú v obrátenej polohe, hore dnom, pri 37 °C v teplovzdušnom termostate. Spodná strana kultivačných misiek by mala byt' vždy označená údajom obsahujúcom informáciu o druhu média, koncentrácie antibiotika, názov bakteriálneho kmeňa a dátum začiatku kultivácie.

Individuálne bakteriálne kolónie sa očkujú pomocou rozteru na väčšiu plochu platne. Tento postup sa používa vtedy, keď nie je možné zabezpečiť kultiváciu v tekutých médiách alebo pri vyhľadávaní pozitívnych klonov po prenose z tzv. "master plate". V takomto prípade sa bakteriálne bunky zmývajú malým množstvom sterilného fyziologického roztoku a sú zakoncentrované centrifugáciou.

Zloženie a príprava kultivačného **LB** média podľa Luria-Bertaniho pre kultiváciu *E. coli*: V 1 litri destilovanej vody sa rozpustí: 10 g bacto-trypton (peptón) , 5g kvasinkového extraktu, 10 g NaCl a 15 g agaru pri príprave tuhých pôd. Hodnota pH je upravená hydroxidom sodným na 7,5.

Agarové pôdy bez antibiotík možno tiež pripravovať do zásoby. V sterilne uzavretých fľašiach je ich možné dlhodobo skladovať pri laboratórnej teplote alebo v chladničke. Pred použitím ich rozvaríme pri teplote 100 °C vo vodnom kúpeli alebo v mikrovlnnej rúre a po ochladení na primeranú teplotu a pridaní termolabilných sterilných zložiek ich vylievame do sterilných kultivačných misiek. Podobným spôsobom sa pripravujú tekuté a tuhé agarové pôdy aj na kultiváciu iných mikroorganizmov. Skladba jednotlivých komponentov obyčajne súvisí s rastovými požiadavkami daného bakteriálneho druhu.

Roztoky antibiotík pripravujeme ako zásobné sterilné roztoky, ktoré sa uchovávajú zmrazené minimálne pri -20°C a na pracovnú koncentráciu sa narieďujú tesne pred pridaním do kultivačného média. **Ampicilín** sa používa vo forme sodnej soli rozpustenej vo vode, zásobný roztok sa pripravuje v koncentrácii 25 mg/mL, koncentrácia v kultivačnom médiu je v rozsahu 50-100 ug/mL. **Chloramfenikol** je rozpustný v 100 % etanole, zásobný roztok sa pripravuje v koncentrácii 35 mg/mL, koncentrácia v kultivačnom médiu je v rozsahu 10-25 µg/mL. **Kanamycín sulfát** je rozpustný vo vode, zásobný roztok sa pripravuje v koncentrácii 25 mg/mL, jeho koncentrácia v kultivačnom médiu je obyčajne 50 µg/mL kultivačného média. **Tetracyklín hydrochlorid** je rozpustný v zmesi etanol-voda (1:1), zásobný roztok sa pripravuje v koncentrácii 12,5 mg/mL, kvôli citlivosti na svetlo sa uchováva v tme, pracovná koncentrácia je obyčajne v rozsahu hodnôt 12,5-15 µg/mL kultivačného média. Tetracyklínové agarové platne je potrebné uchovávať' v tme pri teplote 4°C.

Uchovávanie a uskladňovanie bakteriálnych kultúr

Bakteriálne kolónie môžeme na agarových platniach uchovávať aj niekoľko týždňov v chladničke, platne však musia byt' v obrátenej polohe kvôli kondenzácii vody a zabezpečené pred vysychaním. Po dobu jedného až dvoch týždňov môžeme v chladničke uchovávať aj tekuté bakteriálne kultúry s čiastočnou stratou vitality. Pre dlhšie skladovanie bakteriálnych kmeňov sa pripravujú aj agarové vpichové konzervy, ktoré sa udržujú v tme pri laboratórnej teplote alebo v chladničke. Glycerínové konzervy bakteriálnych kultúr, ktoré uchovávame pri teplote -20 až -70°C, možno skladovať' aj po dobu niekoľkých rokov.

1.2 Izolácia nukleových kyselín

Izolácia nukleových kyselín patrí medzi najpoužívanejšie postupy v biochemickom a molekulárno-biologickom výskume. S rozvojom génového inžinierstva sa tieto postupy podrobnejšie rozpracovali so špecifickým zameraním na jednotlivé druhy nukleových kyselín. Nukleové kyseliny sa v živých organizmoch nevyskytujú voľne, výnimku tvoria čiastočne tRNA, ale vo forme komplexov s bielkovinami, ktoré sú často veľmi stabilné.

Základným problémom pri izolácii nukleových kyselín je odstránenie proteínov a polysacharidov takým spôsobom, aby sa neporušila primárna a sekundárna štruktúra nukleových kyselín, avšak prakticky neexistuje ideálny postup na riešenie tohto problému. Preto sa vypracovali viaceré izolačné postupy, ktoré sú vhodné pre určité typy nukleových kyselín ako sú tRNA, mRNA, microRNA, snRNA, chromozomálna DNA, plazmidová DNA, mtDNA. Pri izolácií nukleových kyselín je v prvom rade potrebné uvoľniť cytoplazmatický bunkový obsah šetrným rozrušením bunkovej steny zloženej prevažne z polysacharidov a cytoplazmatickej membrány tvorenej fosfolipidmi a bielkovinami. V princípe je možné navodiť degradáciu bunkovej steny pôsobením rôznych fyzikálno-chemických a enzymatických metód. Fyzikálnymi metódami sú napríklad mechanické drvenie a trenie buniek, opakované zmrazovanie a rozmrazovanie buniek. Ultrasonografia nie je najvhodnejšia pri izoláciách nukleových kyselín, pretože môže indukovať zostrih lineárnej DNA na kratšie fragmenty. Chemickú degradáciu bunkovej steny je možné dosiahnuť aj pomocou detergentov ako sú dodecylsíran sodný (**SDS**), **Triton X-100** alebo pomocou organických rozpúšťadiel, ktoré solubilizujú molekuly lipidového charakteru ako je napríklad **fenol**, **chloroform**, **izopropylalkohol**. Integrita bunkovej steny je citlivá aj na príliš kyslé alebo bázické prostredie, avšak nukleové kyseliny nepodliehajú hydrolýze v alkalickom prostredí, preto je vhodnejšie používať alkalické podmienky. Taktiež veľmi vysoké a nízke iónové sily ovplyvňujú integritu bunkových membrán. Účinok degradácie membrán sa zvyšuje enzymatickým pôsobením špecifických enzýmov. Najpoužívanejšie enzýmy sú napríklad pri baktériách lyzozým, a pri kvasinkách je to napríklad komplex enzýmov z hepatopankreasu slimáka záhradného a u rastlín sú to rôzne celulázy rozrušujúce polysacharidovú stenu. Za určitých podmienok je možne bunkový obsah uvoľniť pôsobením SDS, či fenolu. Tento spôsob je dostačujúci hlavne pre bunkové systémy, ktorým chýba polysacharidová zložka bunkovej steny napr. pri gramnegatívnych baktériách. Po rozrušení bunkovej steny vzniknuté protoplasty samovoľne

praskajú pokiaľ nie sú osmoticky stabilizované. Zvyšky bunkových stien a väčšie agregáty molekúl a subcelulárnych častíc je možné oddeliť centrifugáciou. Najväčšie problémy vznikajú pri oddeľovaní biopolymérov, hlavne RNA a bielkovín, ktoré môžu byt' s DNA viazané veľkým počtom slabých väzieb. Uvoľnenie DNA z takýchto agregátov uľahčuje napríklad zvýšenie iónovej sily roztoku a rôzne detergenty spomenuté vyššie. Odstránenie bielkovín sa vykonáva použitím deproteinizačných činidiel, ktoré denaturujú a zrážajú bielkoviny, napríklad fenol, chloroform, izoamylalkohol. Iný spôsob odstraňovania proteínov spočíva vo využití enzymatickej aktivity nešpecifických proteáz, napr. pronáza a proteináza K. Výsledkom štiepneho produktu bielkovín sú nízkomolekulové podjednotky. Rýchla denaturácia bielkovín napomáha aj k odstráneniu ich nežiaducich nukleázových aktivít. RNA môže byt' taktiež odstraňovaná pomocou nešpecifických RNáz, napr. RNáza A. Denaturované prezrážané agregáty sa opäť' zvyčajne odstraňujú centrifugáciou. Nízkomolekulové komponenty sú rozpustné v etanole na rozdiel od DNA. Hlavnou prekážkou pri izolácii nukleových kyselín je pomerne vysoká aktivita nukleáz v bunkách. V neporušenej bunke je väčšina nukleáz lokalizovaná v lyzozómoch, avšak pri homogenizácii pri rozrušení bunkových štruktúr sa nukleázy uvoľňujú do roztoku. V priebehu celého izolačného postupu je preto potrebné udržiavať také podmienky, aby nedochádzalo k degradácii DNA prítomnými DNázami. RNázy patria medzi termostabilné enzýmy a súčasne majú aj široké pH optimum. Potlačenie ich aktivity je niekedy problematické a to hlavne pri izolácii RNA molekúl. Medzi inhibítory nukleáz, ktoré sa často používajú pri RNA izolačných technikách patria hlavne [Sambrook a Russell 2001]:

bentonit - účinný inhibítor ribonukleáz z rôznych zdrojov, používa v koncentrácii asi 10 mg/mI.

dietylpyrokarbonát - (**DEPC**, C2HS-O-CO-O-CO-C2HS) je účinným inhibítorom ribonukleáz. Jeho účinok sa zakladá na modifikácii aktívneho centra enzýmu. V niektorých prípadoch ho však nemožno použiť, pretože modifikuje aj samotné nukleové kyseliny. Pri práci s DEPC sa musia dodŕžať bezpečnostné predpisy, pretože látka je značne toxická a karcinogénna.

heparín - znižuje aktivitu ribonukleáz v koncentrácii 50 µg/mL pri teplote 37°C s 95 % účinnosťou. Používa sa zriedkavo, vzhľadom aj na relatívne vysokú cenu. Jeho odstránenie z roztoku nukleových kyselín je problematické, a preto takto izolované nukleové kyseliny nemožno použiť napríklad pri restrikčnej analýze.

prirodzené inhibítory nukleáz - patria medzi glykoproteíny a inhibujú nešpecificky. Vzhľadom na vysokú cenu je však ich použitie obmedzené.

polyamidy - napríklad **spermidín** a **putrescín** inhibujú ribonukleázovú a deoxyribonukleázovú aktivitu.

aniónové detergenty - napríklad SDS, inhibujú ribonukleázovú a deoxyribonukleázovú aktivitu a súčasne zapríčiňujú disociáciu nukleoproteínového komplexu. Vzhľadom k nízkej cene kvôli výraznému účinku sa používajú veľmi často.

komplexotvorné chelatačné činidlá: napríklad **citrát sódny**, **EDTA** (etylén-diamino-tetra-octová soľ kyseliny octovej), **8-hydroxychinolín**. Väčšina deoxyribonukleáz potrebuje pri katalytickom štiepení nukleových kyselín prítomnosť' dvojmocných katiónov (Mg^{2+}, Mn^{2+}), preto je možné ich aktivitu výrazne eliminovať prídavkom komplexotvorných činidiel.

Pri izolačných technikách je potrebné dbať aj na možnosť mechanického poškodenia vysokomolekulových nukleových kyselín. Vznik krátkych fragmentov nukleových kyselín je možné odstrániť obmedzením prudkého pretrepávania a miešania roztokov nukleových kyselín a tiež obmedzením používania pipiet s príliš úzkymi špičkami. Izolácia DNA z bunkových organel si vyžaduje podobné postupy ako pri izolácii bunkovej DNA, pričom sa najprv vyizolujú príslušné organely, obyčajne pomocou centrifugácie v koncentračných gradientoch rôznych látok napríklad sacharózy alebo Ficollu.

1.2.1 Základné princípy izolácie bakteriálnej DNA

Pri izolácii bakteriálnych DNA sa najčastejšie používa metóda [3]. Pri tomto postupe sa bakteriálne bunky opracujú lyzozýmom pri teplote 37°C v prítomnosti EDTA a 25 % roztoku sacharózy, pričom vznikajú sféroplasty, ktoré majú čiastočne zachovanú bunkovú stenu. Na uvoľnenie cytoplazmatického obsahu je výhodné použiť neiónové detergenty (Triton X-100, Tween-20), ktoré nespôsobujú chromozomálne zlomy. Lýza buniek sa prejaví vzrastom viskozity lyzačného roztoku, pretože sa do roztoku uvoľnia dlhé vláknité molekuly, vrátane nukleových kyselín. Chromozomálnu DNA je možné izolovať priamo z primárneho lyzátu, pričom opakovanou extrakciou dosiahneme odstránenie kontaminujúcich bielkovín. K lyzátu pridáme rovnaký objem zmesi chloroform-izoamylalkohol (24:1), miešame asi 20 minút a vodnú fázu oddelíme centrifugáciou. Vrchná vodná fáza obsahuje prevažne nukleové kyseliny, potom nasleduje biela medzifáza, ktorá obsahuje bielkoviny a na spodku je zmes organických rozpúšťadiel. Pokiaľ bol pridaný aj 8-hydroxychinolín spodná fáza je žltá. Extrakcia

s organickými rozpúšťadlami sa opakuje dovtedy, kým sa na rozhraní prestane vytvárať viditeľná zrazenina proteínov. Nukleové kyseliny získame z vrchnej vodnej frakcie zrážaním etanolom. Kontaminujúcu RNA možno z vodnej fázy odstrániť inkubáciou s ribonukleázou pozbavenej reziduálnej DNázovej aktivity.

Druhou metódou, ktorá sa často používa, je Kirbyho metóda, pri ktorej sa na deproteinizáciu používa fenol. Fenol je účinnejšie deproteinizačné činidlo ako chloroform a denaturované proteíny sú čiastočne rozpustné vo fenolovej fáze. Fenol inhibuje aj potenciálne nukleázy. K fenolu sa najčastejšie pridáva 0,1 % 8-hydroxychinolín, ktorý zabraňuje jeho oxidácii so vzdušným kyslíkom a súčasne je aj komplexotvorným činidlom. Jeho žlté sfarbenie napomáha ľahšie rozoznať fenolovú frakciu od bezfarebnej vodnej frakcie. Extrakciu s fenolom je vhodné kombinovať s extrakciou so zmesou fenol:chloroform v pomere 1:1. Z vodnej fázy sa nukleové kyseliny zvyčajne vyzrážajú dvoma objemami vychladeného etanolu. Fenol, ktorý sa neodstránil pri poslednej chloroformovej extrakcii sa odstráni po rozpustení nukleovej kyseliny vo vode alebo **TE** tlmivom roztoku extrakciou éterom alebo dialýzou.

1.2.2 Postup izolácie chromozomálnej DNA z buniek *Streptococcus bovis*

Bakteriálne bunky *S. bovis* získané zo 100 mL **LB** média z nočnej kultúry centrifugáciou 10 min pri 6000 otáčkach za min. pri 4 °C sa premyjú v **premývacom roztoku** (10 mmol.L^{-1} Tris, 10 mmol.L^{-1} EDTA, 0,9 % NaCl) a opätovne rozsuspendujú v 2,5 mL roztoku **TES** (50 mmol.L^{-1} Tris, 5 mmol.L^{-1} EDTA, 10 % sacharóza) a inkubujú 10 minút v ľadovom kúpeli

Do bakteriálnej suspenzie sa pridá 0,5 mL lyzačného roztoku (20 mg lyzozýmu/mL roztoku TE, pH 8,0) a inkubuje 45 minút pri teplote 37 °C v termostate. Potom sa pridá 1 mL , 0.5 mol.L^{-1} EDTA pH 8,0 (chelatačné činidlo na vychytanie voľných dvojmocných katiónov potrebných pre aktiváciu nukleáz) a inkubujeme 5 minút pri 37°C, na záver pridáme 3 mL 3,3 %-ného SDS a pokračujeme v lyzovaní buniek pri 37°C ďalšie 2 hod.

Bunkový lyzát sa extrahuje rovnakým objemom fenolu a následne sa dvakrát extrahuje so zmesou chloroform-fenol (1:1). Na záver sú vodné frakcie extrahované s chloroformom, aby sa odstránili zvyšky fenolu.

K vodnej frakcii sa pridá 1/10 objemu 2,5 mmol.L^{-1} octanu sodného, pH 6,0. Jednomocné katióny podporujú zrážanie DNA, ak roztok DNA obsahuje dostatok

jednomocných katiónov z procesu prípravy, octan sodný nie je potrebné pridávať. Roztok opatrne jemne premiešavame a pridáme dvojnásobný objem vychladeného etanolu, najlepšie po stene skúmavky. Vyzrážaná, vláknitá chromozomálna DNA sa namotá na sklenú tyčinku a premyje v 70 % etanole. DNA sa vysuší na vzduchu alebo v exikátore pri zníženom tlaku vzduchu a rozpustí v 2 mL sterilného roztoku **TE** (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Postup izolácie chromozomálnej DNA z buniek *E. coli*

Izolácia DNA z *E. coli* sa všeobecne vyznačuje miernejšími podmienkami pri lýze buniek, čo priamo súvisí so zložením bunkovej steny gramnegatívnych baktérií. Bunková stena grampozitívnych baktérií obsahuje 50 - 80 % peptidoglykánov, ktoré sú kovalentne viazané s polysacharidmi a teichoovými kyselinami čo spôsobuje ich zvýšenú odolnosť voči chemickému a fyzikálnemu poškodeniu. Naproti tomu bunková stena gramnegatívnych baktérií obsahuje len 1-10 % peptidoglykánov. Celkový postup pre izoláciu chromozomálnej DNA z gramnegatívnych bakteriálnych buniek (G-) je principiálne podobný ako pri izolácii z grampozitívnych buniek (G+). Rozdielne sú väčšinou len podmienky lýzy bakteriálnych buniek, pričom existujú viaceré modifikácie upravené pre jednotlivé bakteriálne kmene.

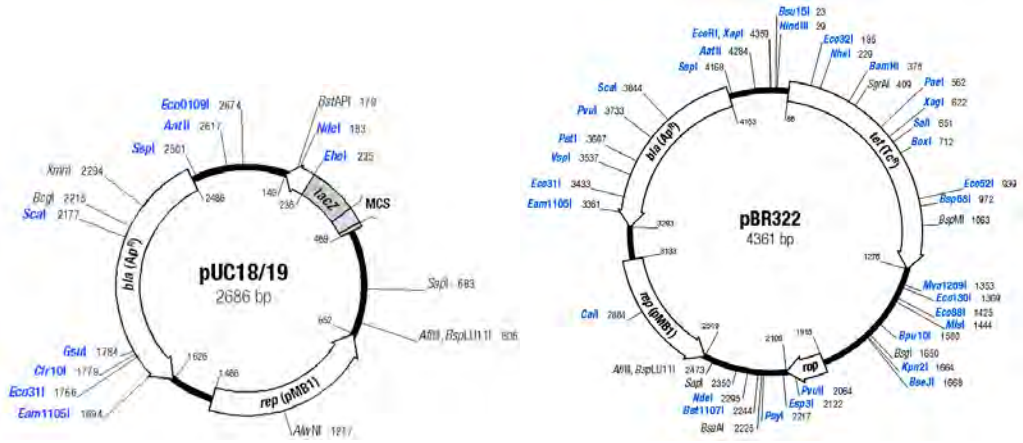
K bakteriálnej suspenzii buniek *E. coli* sa pridá 0,5 mL lyzačného roztoku (5 mg lyzozýmu/ml roztoku TE, pH 8,0) a inkubujeme 20 minút pri laboratórnej teplote. Potom sa pridá 1 ml 0,5 mol.L^{-1} EDTA pH 8,0 a inkubujeme ďalších 5 minút pri laboratórnej teplote, na záver pridáme 3 ml 3,3 % SDS a pokračujeme v lýze pri 0 °C ďalšie 2 hod v ľadovom kúpeli.

Pri extrakcii, zrážaní DNA a následnom spracovaní postupujeme rovnako ako v predchádzajúcom postupe.

Izolácia plazmidovej DNA

Metódy izolácie plazmidovej DNA vychádzajú z vlastností kruhovej uzavretej DNA (cccDNA - covalent closed circular DNA). CccDNA molekuly, ktoré neobsahujú žiadne prerušenia, tzv. zlomy (nicks), sa v roztoku často nachádzajú v super-špiralizovanej (superhelical) forme, ktorá sa vyznačuje špecifickými vlastnosťami odlišnými od lineárnych alebo nickovaných foriem cccDNA. Ak v plazmidovej DNA existuje superhelikálne torzné napätie (superhelikálne vinutie) hovoríme o **sc**DNA forme (supercoil), v prípade, že je jedno vlákno prerušené alebo v štruktúre molekuly DNA nie je indukované superhelikálne napätie, hovoríme o forme otvorenej **oc**DNA (open circular). Plazmidové DNA, či už v oc alebo sc forme, predstavujú len zlomok z celkovej molekulovej hmotnosti chromozomálnej DNA. Superhelikálna štruktúra je kompaktnejšia a odolnejšia voči tzv. strižným silám, tieto molekuly majú odlišné sedimentačné vlastnosti a viažu menej interkalačných činidiel (napr. etídium-bromid) než relaxované formy. Táto posledná vlastnosť sa často využíva aj pri čistení plazmidovej DNA pomocou centrifugácie v hustotnom gradiente chloridu cézneho. Molekuly cccDNA po denaturácii veľmi rýchlo reasociujú (renaturujú) na rozdiel od linearizovaných foriem, pretože jednotlivé vlákna cccDNA sa neoddelia na veľkú vzdialenosť. Práve tieto špecifické vlastnosti superhelikálnych molekúl využívajú niektoré izolačné postupy, napr. lýza varom (boiling lysis). Pri alkalickej lýze sa využíva to, že lineárne formy DNA pri pH 12-12,5 denaturujú na rozdiel od sc formy plazmidovej DNA. Po neutralizácii prostredia na pH 7,0, napr. pridaním octanu draselného, dochádza k tvorbe agregátov DNA, ktoré je možné oddeliť filtráciou alebo centrifugáciou, pričom v supernatante zostáva len sc forma plazmidov a RNA. Značnú časť vektorov, používaných na prenos cudzorodej DNA do recipientných buniek pri molekulovom klonovaní, predstavujú práve vektory odvodené od plazmidovej DNA. Plazmidy sa replikujú nezávisle od replikácie chomozomálnej DNA, preto musia obsahovať sekvenciu **ori** (origin of replication), charakteristickú pre akceptorovú bunku. Plazmidové vektory zároveň obsahujú sekvencie kódujúce selekčné znaky (tzv. markery) a viaceré špecifické sekvenčné miesta rozpoznávané restrikčnými endonukleázami. Väčšinou sa jedná o rezistenciu na určité antibiotikum. Medzi typických predstaviteľov plazmidových vektorov, ktoré sa často využívajú pri klonovaní, patria plazmidy pBR322 a pUC18/19. Plazmid pBR322 má veľkosť 4,3 kb a nesie gény pre rezistenciu na tetracyklín a ampicilín. Cudzorodý fragment DNA sa veľmi často vkladá do oblasti zodpovednej za rezistenciu na tetracyklín, pričom sa rezistencia na toto antibiotikum stráca, pričom je rezistencia na ampicilín stále zachovaná, čo sa využíva ako **selekčný marker** pri identifikácii pozitívnych klonov. Plazmidy série pUC sú menšie (2,7 kb), obsahujú polylinker v

oblasti *lacZ* génu a gén zodpovedný za rezistenciu na ampicilín. Schématicky sú oba typy plazmidových vektorov aj s rozmiestnením dôležitých sekvencií a restrikčných miest znázornené na Obr. 4. MSC – multi cloning sites reprezentuje polylinker. pUC19 a pUC18 vektorové molekuly patria do skupiny tzv. vysoko-kópiových plazmidov, to znamená, že počet kópii v jednej bunke pri dostatočnom selekčnom tlaku je v rozsahu 20-300 plazmidov na jednu bunku. Nízko-kópiové plazmidy sa udržiavajú v 1-5 kópiách na jednu bunku, napr. pBR322.



Obr. 4. Schematické znázornenie restrikčnej mapy najpoužívanejších plazmidových vektorov pUC19 (vľavo) a pBR322 (vpravo) [3].

Pri izolácii plazmidovej DNA z buniek gramnegatívnych a grampozitívnych baktérií platia približne rovnaké princípy ako pri izolácii chromozomálnej DNA, t. j. lýza, extrakcia, zrážanie, a prečistenie. Postupy sú mierne odlišné a prispôsobené v závislosti od veľkosti objemov počiatočnej bakteriálnej kultúry (mini-preparácia, midi-preparácia, maxi-preparácia). Podmienky lýzy buniek sú obyčajne miernejšie, aby sa čo najviac eliminoval únik chromozomálnej DNA z bunky, ktorá spôsobuje kontamináciu plazmidovej DNA pri jej ďalšom použití. Pri príprave buniek *E. coli* na izoláciu rekombinantných plazmidov pridávame do kultivačného média odpovedajúce antibiotiká, ktoré nám prostredníctvom selekčného tlaku zvyšujú výťažky plazmidovej DNA. Pri kultivácii baktérií obsahujúcich pBR322 pridávame do tekutého LB média ampicilín alebo tetracyklín, prípadne zmes obidvoch, klony *E. coli* obsahujúce rekombinantné plazmidy pUC19 vektora je možné kultivovať v prítomnosti ampicilínu, ale aj bez neho.

1.3 Princípy izolácie RNA molekúl

Pri génových manipuláciách sa často využívajú RNA molekuly a z nich sa v ďalších krokoch pripravuje homologická DNA molekula. V bežnej cicavčej bunke je napr. asi 5-15 µg RNA. 80 až 85 % predstavuje ribozomálna RNA, 10 až 15 % transferová RNA a rôzne malé jadrové RNA. Všetky tieto RNA majú charakteristickú veľkosť a je ich možné separovať pomocou gélovej chromatografie, elektroforézy alebo izopyknickej centrifugácie. 1 až 5 % z celkového obsahu predstavuje čo do veľkosti heterogénna mRNA. Prakticky všetky mRNA cicavčích buniek majú na 3' - konci poly-d(A) zakončenie, ktoré umožňuje ich izoláciu afinitnou chromatografiou na oligo-d(dT) celulóze. V mnohých prípadoch sa dá úspešne použiť aj chromatografia na benzoyl- alebo naftyl-celulóze. Izolácia mRNA má význam pri získavaní génov, ktoré majú mozaikovitý charakter štruktúry, kde sa striedajú kódujúce a nekódujúce úseky, exóny a intróny. Takto organizované gény obsahujúce intróny by po prenose do baktérii boli nefunkčné. Zrelá maturovaná mRNA je komplementárna len k exónovým sekvenciám. Proces vyštiepenia intrónov a scelenia jednotlivých exónov z primárneho transkriptu hnRNA sa nazýva zostrih RNA alebo splicing. Určitú mRNA je možné izolovať imunoprecipitáciou polyzómov, ktorá je založená na poznatku, že bielkoviny vznikajúce na ribozómoch môžu reagovať so špecifickými protilátkami voči kompletnej bielkovine. Citlivosť metódy sa ešte zvyšuje pri kombinovanom použití afinitnej chromatografie s monoklonálnou protilátkou zakotvenou na pevnom nosiči. Pri izolácii špecifických mRNA sa protilátkou proti bielkovine kódovanou príslušnou mRNA vyzrážajú polyzómy, ktoré ju práve syntetizujú. Z polyzómov sa izoluje RNA, ktorá teoreticky obsahuje len rRNA a špecifickú mRNA.

Ďalšou možnosťou izolácie určitej frakcie mRNA je frakcionácia celkovej mRNA napríklad centrifugáciou v hustotnom gradiente alebo elektroforézou za denaturačných podmienok. Frakcia mRNA, ktorá zaisťuje pri translácii *in vitro* vznik určitej bielkoviny, je obohatená o príslušnú mRNA. Bielkovinné produkty je možné analyzovať' buď imunoprecipitačnými technikami, alebo detekciou biochemickej a biologickej aktivity.

Práca s natívnymi štruktúrami RNA je omnoho obťiažnejšia ako s DNA, najmä pre všade-prítomnosť RNáz. RNázy sú prítomné na väčšine laboratórneho skla, vo veľkom množstve ich nájdeme aj na prstoch experimentátorov a nachádzajú sa prakticky vo všetkých biologických materiáloch. RNázy sú navyše značne termostabilné a ich úplná inhibícia je náročnejšia ako inhibícia DNáz, pri ktorých stačí odstrániť dvojmocné katióny. Laboratórne sklo sa pred prácou

s RNA odporúča sterilizovať 4 hodiny pri 250°C. Z roztokov a materiálu z plastických hmôt sa RNázy odstraňujú dietylpyrokarbonátom (DEPC) [Sambrook a Russell 2001].

1.4 Fragmentácia DNA

Z hľadiska génového inžinierstva sú významné dva typy fragmentácie DNA: sekvenčne špecifická a nešpecifická. Špecifická je zabezpečovaná výlučne pomocou enzýmov známych ako restrikčné endonukleázy (reštriktázy). Nešpecifická fragmentácia môže byť enzýmová alebo mechanická.

Restrikčné endonukleázy patria medzi modifikačné systémy, kde každý systém je zaisťovaný dvoma druhmi enzýmových aktivít. Prvá funkcia je štiepenie DNA. Druhou funkciou je metylácia, kedy je sekvencia rozpoznávaná reštriktázou metylovaná a chránená voči štiepeniu. Táto modifikácia chráni pred degradáciou bunkovej DNA, kým cudzorodá DNA môže byť degradovaná okamžite po vstupe do bunky.

Restrikčné enzýmy sú bakteriálne enzýmy, ktoré rozoznávajú špecificky sekvencie a následne v rozpoznávanom mieste štiepia obe vlákna DNA. Úlohou týchto enzýmov v bunke je rozpoznávať cudzorodú DNA a štiepiť ju na všetkých rozpoznávaných miestach. Restrikčné endonukleázy boli izolované z niekoľkých stoviek rôznych druhov baktérií, vďaka čomu boli získané enzýmy, ktoré umožňujú štiepiť molekuly DNA na mnohých rôznych miestach v závislosti od rozpoznávanej sekvencie. Názvy enzýmov boli odvodené z názvu organizmu, z ktorého boli izolované. Za skratkou pokračuje číslo, ktoré označuje o koľkú endonukleázu izolovanú z tohto organizmu ide.

Sekvencie rozoznávané reštriktázami majú obvykle dĺžku 4-8 bp, pričom väčšina rozpoznávaných sekvencií je tzv. **palindromických**. To znamená, že poradie báz v jednom smere (5´→3´) na jednom vlákne je zhodné s poradím báz na druhom vlákne v opačnom smere. Ak je štiepenie symetrické, sú obe vlákna rozštiepené v strede rozpoznávanej sekvencie, a vznikajú tzv. tupé konce, napríklad *HpaI*:

5' – GTT↓AAC – 3'
3' – CAA↑TTG – 5'

Reštriktázy, ktoré štiepia DNA asymetricky spôsobujú vznik prečnievajúcich koncov, ktoré nazývame lepivé alebo aj kohézne, napríklad *HindIII*:

5' – A↓AGCTT – 3'
3' – TTCGA↑A – 5'

Pretože štiepenie určitého úseku DNA rôznymi enzýmami prebieha vždy len na špecifických miestach, je možné zostaviť tzv. **restrikčnú mapu** [Víglaský a kol. 2000]. Vzniknuté fragmenty môžeme izolovať agarózovou alebo polyakrylamidovou elektroforézou. Restrikčné endonukleázy sa delia vo všeobecnosti na 4 typy a to na základe zloženia podjednotiek, polohy štiepenia, špecificity sekvencie a požiadaviek kofaktorov.

Enzýmy **typu I** sú komplexné, viac-podjednotkové kombinácie restrikčných a modifikačných enzýmov, ktoré štiepia DNA v náhodnej vzdialenosti od ich rozpoznávanej sekvencie. Pôvodne sa tento jav považoval za náhodu, dnes sa však už vie na základe analýz sekvenovaných genómov, že takéto enzýmy sú bežné. Tieto enzýmy fungujú ako tri rôzne podjednotky. Prvá je zodpovedná za rozlíšenie rozpoznávanej sekvencie a väzbu na DNA, druhá má metyltransferázovú aktivitu (zabezpečuje metyláciu hostiteľskej DNA) a tretia zabezpečuje štiepenie DNA. Pre svoju aktivitu potrebujú S-adenozylmetionín, ATP a Mg^{2+} ióny. Aj keď je táto trieda enzýmov zaujímavá z biochemického hľadiska, nemá veľké praktické uplatnenie pri väčšine rekombinantnej DNA, keďže nedokáže produkovať presne predvídateľné restrikčné fragmenty.

Enzýmy **typu II** štiepia DNA priamo v rozpoznávanej sekvencii alebo v mieste vzdialenom len niekoľko báz od tejto sekvencie. Rozpoznávajú palindromické sekvencie a produkujú definované restrikčné fragmenty s kohéznymi alebo tupými koncami. Pre štiepenie sú nevyhnutné ióny Mg^{2+} a pre modifikáciu S-adenozylmetionín, na rozdiel od enzýmov typu I a III ale nepotrebujú ATP. Restrikčná endonukleáza sa vyskytuje obvykle vo forme monoméru, diméru alebo tetraméru, a funguje nezávisle od prítomnosti metyltransferázy. Prekvapivo medzi týmito enzýmami nebola nájdená žiadna zhoda na úrovni aminokyselín, a to aj napriek tomu, že restrikčný enzým a ku nemu priradená metyltransferáza majú rovnakú špecificitu. Z tohto sa dá vyvodiť, že endonukleázy a metyltransferázy typu II sú po evolučnej stránke nezávislé. Je to jediná trieda používaná v bežnej laboratórnej praxi pri analýze DNA a klonovaní.

Enzýmy patriace do skupiny **typu III** sú najmenšou skupinou z troch klasických typov. Na štruktúre týchto reštriktáz sa podieľajú dve podjednotky – Res a Mod. Podjednotka Res je dôležitá pre štiepenie, vykazuje hydrolázovú aktivitu a štiepi DNA, pričom pre jej funkciu je nevyhnutná prítomnosť ATP a Mg^{2+} iónov. Podjednotka Mod zaisťuje rozpoznávanie špecifických sekvencií DNA pre reštrikciu a modifikáciu, má metylázovú aktivitu a vyžaduje S-adenozylmetionín. Tento typ rozpoznáva dve nepalindromické asymetrické sekvencie, orientované navzájom inverzne, štiepia DNA 20-30 párov báz za týmito sekvenciami. Zároveň sú schopné rozpoznávať iba nemetylovanú DNA a metylujú iba jedno vlákno dvojzávitnice.

Vo väčšine prípadov je určitá sekvencia rozpoznávaná jedinou reštriktázou. Niektoré sekvencie sú však rozpoznávané niekoľkými reštriktázami, tie označujeme ako izoschizoméry. Väčšina restrikčných endonukleáz je citlivá na zvýšenú teplotu a preto je nevyhnutné pracovať s nimi v ľade, aby nedošlo ku ich degradácii. Komerčne dostupné enzýmy sú dodávané spolu s tlmivými roztokmi v zložení nevyhnutnom pre maximálny účinok enzýmu.

Príklady reštrikčných endonukleáz a ich rozpoznávanej sekvencie

Enzým	Zdroj	Cieľová sekvencia
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens H*	$G^{\downarrow}GATCC$ $CCTAG_{\uparrow}G$
BglI	*Bacillus globigii*	$GCCNNNN^{\downarrow}NGGC$ $CGGN_{\uparrow}NNNNCCG$
EcoRI	*Escherichia coli RY 13*	$G^{\downarrow}AATTC$ $CTTAA_{\uparrow}G$
HindIII	*Haemophilus influenzae Rd*	$A^{\downarrow}AGCTT$ $TTCGA_{\uparrow}A$
KpnI	*Klebsiella pneumoniae*	$GGTAC^{\downarrow}C$ $C_{\uparrow}CATGG$
PstI	*Providencia stuartii*	$CTGCA^{\downarrow}G$ $G_{\uparrow}ACGTC$
PvuI	*Proteus vulgaris*	$CGAT^{\downarrow}CG$ $GC_{\uparrow}TAGC$

1.5 Ligácia DNA

Enzýmy, ktoré katalyzujú spájanie fragmentov DNA, teda vznik esterových väzieb medzi polynukleotidovými reťazcami sa nazývajú **ligázy**. Ligácia kohéznych koncov je technicky nenáročná technika. DNA ligázy obnovujú spojenie vlákien DNA v prítomnosti Mg^{2+} iónmov,

pričom energia potrebná na prebehnutie reakcie je dodávaná vo forme ATP. Vďaka týmto vlastnostiam je napr. T4 DNA ligáza významná pri rekombinácii molekúl DNA i*n vitro*.

Obdobne, fragmenty ssDNA alebo RNA môžu byť spájané pomocou T4 RNA ligázy, ktorá je izolovaná z rovnakého zdroja ako T4 DNA ligáza.

1.6. Príprava kompetentných buniek a transformácia DNA

Transformácia je proces, prostredníctvom ktorého bunky akceptujú cudzorodú DNA a začlenia ju do svojho genómu. Jediné organizmy okrem kvasiniek, ktoré sú schopné transformácie v prirodzených podmienkach sú baktérie, kým bunky vyšších organizmov sú schopné prijať inú DNA len s využitím špecifických laboratórnych techník. Nukleové kyseliny za bežných podmienok nedokážu samovoľne prekonať bunkovú stenu a dostať sa do vnútra buniek. Tomuto procesu je potrebné napomôcť. Existuje niekoľko takýchto metodických postupov, ktoré uľahčujú prechod DNA cez bunkovú stenu. V laboratórnych podmienkach sa na uľahčenie transformácie používajú chemické a fyzikálne opracovania bunkových stien. V týchto učebných textoch sa budeme venovať predovšetkým chemickým metódam.

Voľbou vhodných podmienok sa dajú upraviť povrchové štruktúry niektorých buniek natoľko, že je umožnený vstup DNA do buniek – príprava tzv. **kompetentných buniek**. Väčšina transformovateľných baktérii sa stáva kompetentnými po kultivácii v určitých špecifických podmienkach. Chemické metódy v súčasnosti používané na transformáciu sú založené na pozorovaniach Mandela a Higa (1972), ktorí prví dokázali, že baktérie opracované ľadovo vychladeným roztokom $CaCl_2$ a na chvíľu zahriate na 37-42°C prijali DNA bakteriofága λ. Rovnaká metóda bola následne použitá na transformáciu baktérií s plazmidovou DNA a *E. coli* chromozomálnou DNA [Sambrook a Russell 2001]. Efektívnosť prirodzenej transformácie je veľmi nízka (1 z 10^6 molekúl DNA), avšak po opracovaní buniek roztokmi chloridu vápenatého efektívnosť dosahuje 10^5-10^7 transformantov na 1 µg plazmidu. Presný mechanizmus transformácie DNA s využitím $CaCl_2$ nie je zatiaľ objasnený. Predpokladá sa, že pozitívne nabité ióny vápnika sprostredkovávajú väzbu medzi povrchom bunky a negatívne nabitou DNA. Inkubáciou na ľade dôjde ku obmedzeniu pohybu molekúl, čím dochádza ku podporeniu väzbového procesu. Zároveň dochádza ku čiastočnému poškodeniu membrány. Následný

teplotný šok spôsobí, že sa póry bunkovej membrány na krátku chvíľu pootvoria a DNA môže vstúpiť do bunky.

Následne sú bunky vynesené na tuhé médium aj s obsahom vhodného antibiotika, čím dôjde ku vytvoreniu selekčného tlaku a klonovaniu rekombinantnej DNA.

1.5 Úlohy

1.5.1 Príprava LB média a očkovanie

Pomôcky a chemikálie: Erlenmeyerova banka, autokláv/tlakový hrniec, LB médium/tryptón + extrakt z kvasiniek + NaCl, destilovaná voda, antibiotikum, bakteriálne inokulum.

Pracovný postup

Pripravíme si 1L **LB** média navážením: 10 g tryptónu, 5 g extraktu z kvasiniek a 10 g NaCl. Navážky rozpustíme v 1L destilovanej vody v Erlenmayerovej banke, sterilizujeme v autokláve po dobu 15-20 minút. Po ochladení je LB pripravené na použitie a ďalej pracujeme v sterilnom boxe.

Do objemu 10-100 mL pridáme antibiotikum (ampicilín 100 µg/ml), vysterilizujeme nad plameňom aj špičku pipety, ktorou pridáme potrebné množstvo bakteriálneho inokula priamo do LB média. Banku uzavrieme, vložíme do inkubačného boxu pri teplote 37 °C a necháme za stáleho miešania inkubovať cez noc.

1.5.2 Meranie rýchlosti rastu bakteriálnych kultúr

Pomôcky a chemikálie: bakteriálne kultúry v tekutom médiu, LB médium, ampicilín, pipety, kyvety, UV spektrofotometer.

Pripravíme si 20 mL LB média s ampicilínom, do ktorého naočkujeme nočnú kultúru *E. coli*. Odmeriame absorpciu pri vlnovej dĺžke 600 nm a kultúry vložíme do inkubátora s teplotou 37°C. Každú hodinu odoberieme vzorku z média a odmeriame jej absorpciu. Na záver ešte zmeriame absorbanciu pôvodnej nočnej kultúry.

Namerané hodnoty vynesieme do grafu oproti času a vyhodnotíme rastovú krivku.

1.5.3 Izolácia plazmidovej DNA pomocou alkalickej lýzy

1. Baktérie z 1-1,5 mL nočnej kultúry (napr. *E. coli* HB 101 obsahujúcej plazmid pBR322 alebo pUC19) centrifugujeme 1 minútu pri 12 000 g (postačí stolová mini-centrifúga) pri laboratórnej teplote alebo pri 4 °C.
2. Supernatant odsajeme a bakteriálne bunky rozsuspendujeme pomocou stolovej trepačky (Vortex) v 0,1 mL vychladeného roztoku **TEG** (25 mmol.L^{-1} Tris-HCl, 10 mmol.L^{-1} EDTA, 50 mmol.L^{-1} glukóza, , pH 8,0) tesne pred použitím môžeme do roztoku TEG pridať aj 1 mg lyzozýmu na 1 ml výsledného roztoku.
3. Bakteriálnu suspenziu inkubujeme 5 minút v ľadovom kúpeli.
4. Pridáme 0,2 mL čerstvo pripraveného **alkalického roztoku SDS** (0,2 M NaOH, 1 % SDS) a zľahka premiešame obracaním Eppendorfovej mikroskúmavky (3-6-krát). Inkubujeme 5 minút v ľadovom kúpeli.
5. Pridáme 0,15 mL **neutralizačného roztoku** (objem 100 mL obsahuje 60 mL 5 mol.L^{-1} octanu draselného, 11,5 mL ľadovej kyseliny octovej a 28,5 mL destilovanej vody) a premiešame zľahka obracaním Eppendorfovej mikroskúmavky. Inkubujeme 15 minút v ľadovom kúpeli.
6. Centrifugujeme 5 minút pri 12 000 g pri 4°C a supernatant prenesieme do novej mikroskúmavky.
7. Pridáme rovnaký objem roztoku **fenol-chloroform** (1:1) a skúmavku dôkladne premiešame viacnásobným intenzívnym pretrepaním (roztok by mal byt' celý rovnomerne zakalený).
8. Centrifugujme 2 minúty pri 12 000 g pri 4 °C, extrakciu a centrifugáciu opakujeme ešte minimálne dvakrát.
9. Dvojvláknovú DNA zrážame s dvoma objemami vychladeného **96 % etanolu** v mrazničke (aspoň -20°C) asi 30-60 minút. Keď je DNA menšia ako 1 kb alebo jej koncentrácia je nižšia ako 0,1 µg/mL, je vhodné predĺžiť čas zrážania alebo znížiť teplotu zrážania až na -70°C.
10. Centrifugujeme pri 12 000 g, 5 minút pri 4°C. Ak je koncentrácia DNA nízka môžeme čas centrifugácie predĺžiť na 30 minút.
11. Supernatant odsajeme, skúmavku postavíme hore dnom na filtračný papier a odstránime všetky kvapky etanolu zo stien skúmavky.

12. Zrazeninu DNA opatrne premyjeme vychladeným **70 % etanolom** (týmto krokom odstránime zvyšky soli, ktoré sa vyzrážali spolu s DNA). Neodstránenie prítomných solí môže zmeniť optimálne podmienky pre ďalšie procedúry, napríklad pre restrikčnú analýzu DNA po pridaní odpovedajúceho tlmivého roztoku pre príslušnú restrikčnú endonukleázu - RE. Vzorku vysušíme vo vákuu a rozpustíme v 50 µL roztoku **TE**, ktorý obsahuje pankreatickú RNázu bez DNázovej aktivity (20 µg/mL). Kontaminujúcu RNA odstránime inkubáciou 15 minút pri 37 °C. Po tomto kroku môže nasledovať jedna extrakcia s chloroformom na odstránenie RNázy.

Opracovanú plazmidovú DNA môžeme po ochladení použiť priamo na ďalšie manipulácie alebo ju dlhodobo uchovávame pri -20 °C.

1.5.4 Izolácia plazmidovej DNA lýzou indukovanou varom

Pri tomto izolačnom postupe sa využíva fakt, že nepoškodená plazmidová DNA renaturuje aj po krátkodobom zahriatí na vysoké teploty na rozdiel od chromozomálnej DNA, jedná sa o tzv. boiling procedure.

1. Bakteriálny pelet získaný z 1,5 ml nočnej bakteriálnej kultúry *E. coli* obsahujúcej plazmidovú DNA rozsuspendujme v 350 µL roztoku **STET** (0,1 mol.L^{-1} NaCl, 10 mmol.L^{-1} Tris-HCl, 1 mmol.L^{-1} EDTA, pH 8,0, 5 % Triton X-100).
2. Pridáme 25 µL čerstvo pripraveného roztoku lyzozýmu (10 mg/mL v 10mmol.L^{-1} Tris-HCl, pH 8,0) a premiešame na stolovej trepačke (aktivita lyzozýmu je inhibovaná v roztokoch, ktorých hodnota pH je menšia ako 8,0).
3. Obsah skúmavky umiestnime do vriaceho vodného kúpeľa na 40 sekúnd.
4. Bakteriálny lyzát centrifugujme pri 12 000 g, 10 minút pri laboratórnej teplote.
5. Zvyšky baktérii odstránime z centrifugačnej skúmavky pomocou sterilného špáradla.
6. K supernatantu pridáme 40 µL 2,5 mol.L^{-1} octanu sodného (pH 5,2) a 420 µL izopropanolu, premiešame na trepačke a necháme odstáť 5 minút pri laboratórnej teplote. Poznámka: Izopropanol pridávame vtedy, keď chceme zachovať nízky objem vzorky pre ďalšie spracovanie. Jeho nevýhodou je nižšia prchavosť a ťažšie odstraňovanie jeho zvyškov. Roztoky DNA, ktoré obsahujú sacharózu alebo NaCl sa s

izopropanolom zrážajú ľahšie, ale DNA vyzrážaná izopropanolom sa horšie rozpúšťa v TE tlmivom roztoku.

7. Zrazeninu nukleových kyselín oddelíme centrifugáciou pri 12 000 ot./min, 5 minút pri 4°C.
8. Supernatant odsajeme, skúmavku postavíme do inverznej polohy na filtračný papier a odstránime všetky kvapky izopropanolu zo stien skúmavky.
9. Zrazeninu DNA premyjeme s vychladeným 70 % etanolom. Tento krok pomôže odstrániť zvyšky izopropanolu a zvýši rozpustnosť vzorky DNA v TE. Zrazeninu vysušíme vo vákuu a rozpustíme v 50 µL roztoku TE, ktorý obsahuje pankreatickú RNázu bez DNázovej aktivity (20 µg/ mL). Kontaminujúcu RNA odstránime inkubáciou 15 min pri 37°C. Poznámka: Po tomto kroku môže nasledovať extrakcia s chloroformom na odstránenie zvyškov RNázy.
10. Opracovanú plazmidovú DNA môžeme po ochladení použiť priamo na ďalšie experimenty alebo ju uchovávame pri -20°C.

Uvedené metodiky môžu byt' modifikované aj na väčšie objemy kultivačného média. Pri izolácii plazmidovej DNA môžeme použiť aj hotové komerčne dostupné súpravy, ktoré nám umožňujú izolovať plazmidovú DNA v klonovacej čistote, v rôznych množstvách (napr. Mini, Midi a Maxi Qiagen kit).

1.5.5 Fragmentácia DNA

Pomôcky a chemikálie: plazmidová DNA, komerčne dostupné restrikčné endonukleázy, tlmivé roztoky, roztok Mg^{2+}, ultračistá voda, roztok BSA (bovine serum albumin)

Pripravíme si reakčnú zmes do celkového objemu 20 µl: 4 µL plazmidovej DNA, 2 µL tlmivého roztoku pre danú endonukleázu, 2 µL roztoku $MgCl_2$ (50 $mmol^{-1}$), 0,2 µL roztoku BSA (0,1 %), 12 µL ultračistej vody, 5 U restrikčnej endonukleázy (ich množstvo v celkovom objeme zanedbávame)

Pripravíme si 2 vzorky, kde navyše pridáme v rôznych koncentráciách vybraný ligand zo zásobného 10 mmol. L^{-1} roztoku (napr. Tioflavín T, tiazolová oranž, aktinomycín D).

Všetky pripravené vzorky vložíme na hodinu do termostatu pri teplote 37°C. Po uplynutí tohto času zastavíme reakciu podľa pokynov ku danému enzýmu.

Následne vzorky analyzujeme pomocou agarózovej elektroforézy v 1 % agarózovom géle. Ako referenčnú vzorku použijeme vhodne zvolený štandard (DNA ladder) a nepoštiepenú plazmidovú DNA.

1.5.6 Príprava kompetentných buniek a transformácia

Pomôcky a chemikálie: plazmidová DNA, komerčne dostupné restrikčné endonukleázy, tlmivé roztoky, roztok Mg^{2+}, ultračistá voda, roztok BSA

Vychádzame zo 100 mL nočnej kultúry *E.coli* bez ampicilínu.

1. Médium ochladíme na 4°C počas 10 minút a následne centrifugujeme 10 minút pri 4 000 ot./min pri 4°C. Supernatant vylejeme, tuby necháme jednu minútu v obrátenej polohe aby sme odstránili čo najviac supernatantu.
2. Bakteriálne pelety rozsuspendujeme v 10 mL ľadovo vychladeného 200 $mmol.L^{-1}$ roztoku $CaCl_2$ a necháme na ľade inkubovať 30 minút.
3. Centrifugujeme opäť 10 minút pri 4 000 rpm pri 4°C, supernatant vylejeme, tuby necháme jednu minútu v obrátenej polohe.
4. Pelety rozsuspendujeme v 2 mL ľadovo vychladeného 80 $mmol.L^{-1}$ roztoku $CaCl_2$ a rozdelíme do mikroskúmaviek po 200 µL.
5. Ku 200 µL kompetentných buniek pridáme plazmidovú DNA (nie viac ako 50 ng v objeme 10 µL) a inkubujeme na ľade 10 minút.
6. Vzorky dáme inkubovať presne na 90 sekúnd do termostatu nastaveného na 42°C. Po uplynutí času dáme bunky opäť na ľad na 1-2 minúty.
7. Následne do vzoriek pridáme po 800 µL LB média s 20 mM glukózou bez ampicilínu a necháme inkubovať 45 minút pri teplote 37°C. Bunky vynesieme na tuhé médiá.

1.5.7 Kultivácia na tuhých médiách

Pomôcky a chemikálie: Petriho misky, LB médium, agar, ampicilín, sklenená tyčinka v tvare písmena L, bakteriologická kľučka

Pripravíme si pevné agarové médium (na 1 platňu 30 ml) navážením: 15 g agaru na 1 liter LB média. Médium sterilizujeme, po ochladení na teplotu asi 37°C pridáme ampicilín (100 µg na 1 ml média) a nalejeme do vopred vysterilizovaných Petriho misiek. Necháme vytuhnúť pod UV svetlom a v sterilnom boxe nanášame asi 200 µL buniek po transformácii na platne rozotieraním pomocou vysterilizovanej sklenenej tyčinky v tvare písmena L (snažíme sa bunky postupne votrieť do média až kým povrch nie je drsný). Pripravíme si aj agarovú platňu, na ktorú nanesieme bunky pomocou vysterilizovanej bakteriologickej kľučky.

Platne necháme v termostate pri 37°C v obrátenej polohe, 24-48 hodín. Po objavení sa bunkových kolónií odoberieme samostatné kolónie do malého objemu tekutého média (20 mL).

2 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Polymerázová reťazová reakcia, známa aj ako PCR (polymerase chain reaction) je rýchla, lacná jednoduchá metóda na množenie špecifických fragmentov DNA už z minimálneho množstva DNA. Patrí k najprogresívnejším molekulárno-biologickým metódam so širokým spektrom využitia. Bola vyvinutá v roku 1983 Karym Mullisom a štandardne sa používa v molekulárnej biológii, genetike, mikrobiológii, fyziológii, medicíne ako aj v mnohých iných oblastiach biologického výskumu [Víglaský a kol. 2000].

2.1. Základné podmienky prípravy reakčného roztoku PCR

PCR je exponenciálna reakcia, ktorá sa používa na zmnoženie (amplifikáciu) určitého úseku DNA za využitia enzýmu DNA polymerázy. Na vymedzenie amplifikovaného úseku v DNA sa využívajú krátke oligonukleotidy nazývané **priméry**, ktoré sa komplementárne párujú s templátom DNA a následne DNA polymeráza zaháji syntézu ostatnej časti komplementárneho vlákna v smere 5´→ 3´. Nevyhnutnou podmienkou pri PCR je denaturácia dvojvláknovej DNA, ktorá je indukovaná zvýšením teploty nad 95 °C. Pri PCR využívajú termostabilné rekombinantné DNA polymerázy odvodené od ***Taq* polymerázy**, pôvodne získanej z hypertermofilného mikroorganizmu *Thermus aquaticus*. Tieto polymerázy vykazujú optimálnu aktivitu pri teplote 72°C. *Taq* polymeráza vyžaduje ako kofaktor horečnaté ióny (Mg^{2+}) a špecifický tlmivý roztok, v ktorom je optimálne aktívna a stabilná. Nevyhnutnou súčasťou reakcie sú deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTP), ktoré sú zdrojom jednotlivých báz v amplifikovanej DNA. Všetky štyri zložky - dATP, dCTP, dTTP a dGTP – sa musia v zmesi vyskytovať v rovnakom pomere. Optimálna zmes dNTP je obvykle komerčne dostupná. Zmes primérov, DNA polymerázy, dNTP, horčíka a tlmivého roztoku sa nariedi v sterilnej destilovanej vode a vzniká tzv. **mastermix**. Na záver sa pridáva vzorka DNA, ktorá slúži ako templát. Amplifikácia reakčnej zmesi sa vykonáva termocykléri.

2.2 Návrh primérov

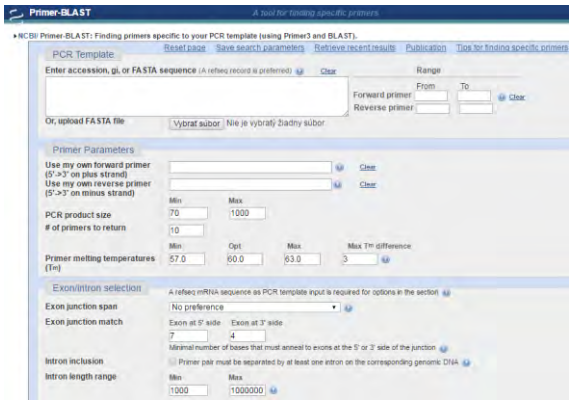
Priméry sú syntetické oligonukleotidy, pričom pri ich návrhu je potrebné splniť základné pravidlá týkajúce sa dĺžky ich samotnej sekvencie.

Dĺžka primérov je rozsahu 16-25 nukleotidov. Práve táto dĺžka je dostatočná na dosiahnutie požadovanej špecificity a selektivity a zároveň sú dostatočne krátke na to, aby sa preferenčne viazali s templátom DNA, pred jeho renaturáciou. Selektivita znamená, napr. primér s dĺžkou 16 nt sa nachádza v randomizovanej sekvencii o dĺžke $4^{16} = 4{,}3.10^{9}$ nt len raz.

Termodynamický aspekt. Teplota topenia primérov pri väzbe s komplementárnou sekvenciou by mala dosahovať teplotu topenia v rozsahu 52-58°C. Priméry s teplotou topenia vyššou ako 65°C majú tendenciu hybridizovať sa s templátom aj 1-2 bodovými mutáciami. Tento rozsah teplôt topenia obyčajne dosahujú sekvencie, ktorých obsah G:C párov je v rozsahu 40-60 %.

Sekundárne štruktúry. Schopnosť primérov vytvárať sekundárne štruktúrne motívy alebo ich hybridizácia medzi sebou by mohla viesť ku zníženému, či dokonca žiadnemu výťažku produktu.

V súčasnosti nie je dizajn primérov pre potreby bežných laboratórií problémom. Existuje niekoľko voľne dostupných databáz a programov, pomocou ktorých je relatívne jednoduché navrhnúť vhodné sekvencie. Príkladom takejto databázy je NCBI - National Center for Biotechnology Information, kde okrem iných užitočných databáz môžeme nájsť bioinformatický softvér na návrh optimálnych sekvencií primérov: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/.



2.3 Popis reakčných krokov pri PCR

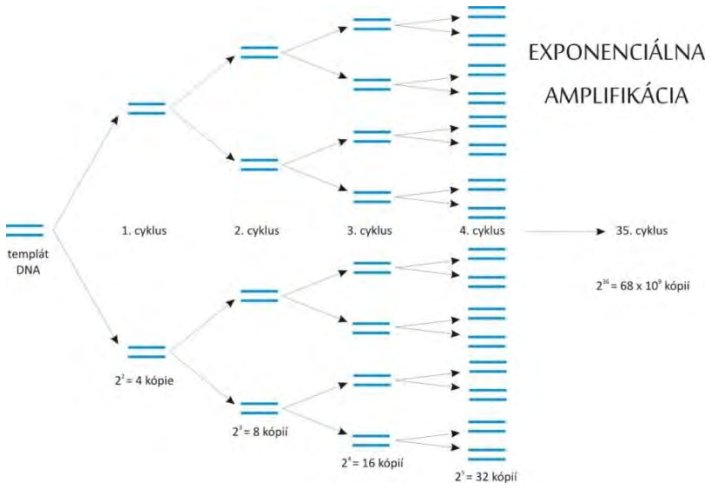
Prvým krokom PCR je iniciácia denaturácie templátu DNA, kedy je reakčná teplota zvýšená na 94-96°C po dobu najmenej 5 minút. Následne sa cyklicky opakujú 3 základné kroky:

Denaturácia: prebieha pri teplote 94-98°C po dobu 20-30 sekúnd. V tomto kroku dochádza ku prerušeniu vodíkových väzieb medzi komplementárnymi bázami, nastáva oddelenie jednotlivých vlákien templátu DNA a vznikajú jednovláknové molekuly DNA.

Annealing (hybridizácia): reakčná teplota je znížená na 40-72°C počas 20-40 sekúnd pričom nastáva hybridizácia primérov s jednovláknovou templátovou DNA. Teplota musí byť dostatočne nízka, aby prebehla hybridizácia, avšak dostatočne vysoká, aby bola hybridizácia špecifická. Obvykle je teplota v tomto kroku len o 3-5°C nižšia ako je teplota topenia použitých primérov.

Extenzia (elongácia): teplota tohto kroku je dôležitá pre správnu aktivitu Taq-polymerázy, obvykle prebieha pri teplote 72°C. DNA polymeráza syntetizuje komplementárny reťazec DNA, pričom ako stavebné jednotky využíva dNTP.

Tieto tri kroky dokopy tvoria jeden cyklus PCR, obvykle prebehne 20-40 cyklov, kedy sa zo stopového množstva DNA dajú získať stovky ng až jednotky µg DNA, Obr. 5. Posledným krokom je **záverečná elongácia**, ktorá prebehne iba raz, pri teplote 70-74°C počas 5-15 minút. Počas tejto doby dôjde ku ukončeniu všetkých polymerizačných reakcií, ktoré aktuálne prebiehajú.



Obr. 5. Schematické znázornenie priebehu PCR.

2.4 Analýza produktov PCR

Elektroforetická analýza je najvyužívanejšia metóda analýzy PCR produktov, (viď ďalšia kapitola). Fragmenty DNA sa vizualizujú v agarózovom géle, napríklad pomocou etídium-bromidu (EtBr) alebo inej menej toxickej a mutagénnej látky pri UV svetle. Veľkosť produktu PCR sa porovnáva so štandardom o známej veľkosti. Pokiaľ takýto štandard nemáme, používame tzv. DNA ladder, t.j. zmes oligonukleotidov o definovanej dĺžke. Ak veľkosť fragmentu v géle zodpovedá očakávanej veľkosti fragmentu, výsledok je považovaný za pozitívny.

Ak je výsledná sekvencia PCR produktu známa a vyskytujú sa tam štiepne miesta pre restrikčné enzýmy, môžeme následným štiepením restrikčnými enzýmami získať fragmenty o známej veľkosti, čím na základe sekvenčného polymorfizmu verifikujeme, či získaný PCR produkt predstavuje skutočne očakávanú sekvenciu. Štiepne produkty následne analyzujeme elektroforetickou analýzou.

2.5 Praktické využitie PCR

2.5.1 PCR analýza STR oblastí na určenie príbuzenstva

Jeden z najvýznamnejších objavov vo forenznej oblasti v 20. storočí predstavuje možnosť určenia príbuzenstva využitím polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) využívajúcej analýzu oblastí krátkych tandemových repetícií (STR- Short Tandemic Repeat) (Alford et al 1994;. Sacchetti et al 1999). STR oblasti sú polymorfné markery nachádzajúce sa v chromozóme a pozostávajú z rôzneho počtu tandemových repetícií s dĺžkou v rozsahu od dvoch do šiestich nukleotidov, ktoré môžu byť jednoducho amplifikované pomocou PCR.

Variabilná povaha STR oblastí umožňuje jednoduché odlíšenie jedného DNA profilu od druhého nakoľko ľudia, ktorý nie sú v príbuzenskom vzťahu majú rozdiely v počte repetícií STR oblastí. Tieto STR oblasti sú ohraničené pomocou sekvenčne špecifických primérov. Táto metóda poskytuje mnoho výhod, a to predovšetkým z dôvodu potreby veľmi malého množstva biologických vzoriek obsahujúcich DNA a možnosti použitia aj čiastočne poškodených vzoriek. Výsledkom sú DNA fragmenty, ktoré môžu byť separované a detegované prostredníctvom agarózovej gélovej elektroforézy, resp. kapilárnej elektroforézy.

FBI využíva systém trinástich STR markerov, ktoré od roku 1997 predstavujú jadro laboratórneho kombinovaného DNA indexovacieho systému (CODIS). Bežné laboratóriá využívajú štandardizovaný a právne prijatý systém amplifikácie DNA za využitia siedmych sád primérov ohraničujúcich oblasti D21S11, Penta E, D18S51, TH01, CSF1PO, D7S820 a D13S317. Jednotlivé sekvencie DNA primérov s ich vlastnosťami sú uvedené v nasledujúcej tabuľke [Fraige 2013]:

Oblasť	Sekvencia priméra	Tandemová repetícia	Veľkosť alely
D21S11	**A:**ATATGTGAGTCAATTCCCCAAG **B:**TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG	$(TCTA)_n(TCTG)_n[(TCTA)_3TA(TCTA)_3$ $TCA(TCTA)_2TCCATA](TCTA)_n$	214-240
Penta E	**A:**GATCAAGACCAGCCTGGGCA **B:**TGGGTTATTAATTGAGAAAACTCCTTACAATTT	$(AAAGA)_n$	260-300
D18S51	**A:**CAAACCCGACTACCAGCAAC **B:**GAGCCATGTTCATGCCACTG	$(AGAA)_n$	274-318
TH01	**A:**GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT **B:**GTGATTCCCATTGGCCTGTTCCTC	$(AATG)_n$	154-178
CSF1PO	**A:**AACCTGAGTCTGCCAAGGACTAGC **B:**TTCCACACACCACTGGCCATCTTC	$(AGAT)_n$	299-323
D7S820	**A:**TGTCATAGTTTAGAACGAACTAACG **B:**CTGAGGTATCAAAAACTCAGAGG	$(GATA)_n$	198-222
D13S317	**A:**GTTGCTGGACATGGTATCACAG **B:**TCAGAGAGCTTGAATTGTTGGT	$(GATA)_n$	245-261

A-primér vedúceho vlákna **B-**primér vedľajšieho vlákna

2.5.2 PCR detekcia ľudského papilomavírusu (HPV)

Ľudský papilomavírus (HPV) je etiologickým činiteľom rakoviny krčka maternice a patrí medzi najčastejšie pohlavne prenosné choroby vyskytujúce sa u žien. PCR amplifikácia HPV genómu predstavuje najcitlivejšiu metódu detekcie HPV. Do dnešnej doby bolo z klinických vzoriek identifikovaných viac než 185 typov HPV. Špecifické typy mukozotropných HPV sú považované za sexuálne prenosné činitele rakoviny krčka maternice a cervikálnej intraepiteliálnej neoplázie. Ukázalo sa, že PCR je najcitlivejším spôsobom identifikácie infekcie HPV v klinických vzorkách. Rôzne kombinácie primérov amplifikujúcich fragmenty DNA z rôznych oblastí genómu HPV boli vyvinuté za účelom detekcie HPV. Najrozšírenejším typom v klinických a epidemiologických štúdiách sa stali priméry amplifikujúce fragmenty DNA v konzervatívnej oblasti L1 genómu HPV. Široko používaná sada primérov MY09/MY11 ohraničuje 450 bp dlhú konzervatívnu sekvenciu v HPV L1 géne a z toho dôvodu je schopná

amplifikovať široké spektrum genitálnych typov HPV. Pri amplifikácii sa využíva podobnosť v sekvenciách jednotlivých typov HPV, ktoré slúžia ako ciele ohraničené primérmi. Nakoľko však jednotlivé ciele nie sú úplne homologické, do pozície ktoré vykazujú heterogénnu bázu boli zahrnuté degenerované bázové miesta.

Rozdiely v jednotlivých HPV sekvenciách ohraničovaných primérmi MY09/11. Degenerovaný bázový kód je nasledovný M= A alebo C, W= A alebo T, Y= C alebo T, R= A alebo G [Depuydt 2007].

Typ HPV	**MY09 (5´ primér- sense)** 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'	**MY11 (3´primér- antisense)** 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'
16	… ..T … … … … ..	… … ..C ..C … … ..
18	… … … … ..T … ..	… … … … … … ..
31	..A … ..T … … … ..	..T … … ..C … … ..
33	… … … … … … ..	… ..A … … … … ..
35	..G … ..C … … … ..	… ..A ..C … … … ..
39	… … … ..G ..T … ..	… … ..C ..C … … ..
45	..A … … … ..T … ..	… … ..C … … … ..
51	..A … ..T .C. ..T ..G ..	..G … … ..C … … ..
52	.TA ..T … … … … ..	..G … ..C ..C … … ..
53	.TG … … … … … ..	… … … … … … ..
56	.TA … ..T … ..T … ..	… ..A ..C … … … ..
58	… … … … … … ..	… ..A ..C … … … ..
59	… … … … … … ..	..T … … TTA … … ..
66	.TA … … … … … ..	… … ..C … … … ..
67	.TA ..T … … ..T … ..	… ..A … … … … ..
68	… ..T ..T ..G ..T ..G ..	… … … ..C … … ..

Konkrétne sa použila zmes 24 rôznych oligonukleotidov na vytvorenie degenerovanej knižnice schopnej amplifikovať široké spektrum HPV genotypov s rozličnou úrovňou citlivosti. Vloženie nukleotidových báz do pozícií degenerácie je náhodný proces a preto nezabezpečuje ekvivalentné zastúpenie všetkých primérov. Rozdiely vznikajúce medzi jednotlivými syntézami primérov môžu viesť k rozdielom v typovo špecifickej účinnosti amplifikácie. Vyhodnotenie produktov PCR reakcie je možné využitím napr. jednorozmernej agarózovej gélovej elektroforézy kedy prítomnosť produktu znamená infekciu jedným z amplifikovaných typov HPV. Jednotlivé druhy HPV, ktoré možno sadou primérov MY09/MY11 možno identifikovať a ich amplifikované oblasti sú zhrnuté v uvedenej tabuľke [Depuydt 2007].

2.6 Úlohy

2.6.1 PCR reakcia inhibovaná ligandom

Pomôcky a chemikálie: templát DNA, priméry, *Taq* polymeráza, tlmivý roztok pre polymerázu, dNTP, 25 mM roztok $MgCl_2$, sterilná voda, termocyklér

Reakciu budeme vykonávať v celkovom objeme 20 µL: 2 µL templátu DNA (zriedený v pomere od 1:500 až 1:2000), 2 µL z oboch primérov, 2 µL $MgCl_2$ (25 $mmol.L^{-1}$), 2 µL dNTP, 2 µL zásobného tlmivého roztoku pre polymerázu, 8 µL sterilnej vody, 1U *Taq* polymerázy.

Pripravíme si viac vzoriek, kde jedna vzorka bude kontrolná a namiesto templátu DNA do nej pridáme len alikvotné množstvo sterilnej vody, aby sme sa uistili, či nedošlo počas práce ku nepredvídanej kontaminácii. Ďalej si pripravíme 3 vzorky, kde jedna bude bez a ďalšie s prídavkom vybraného ligandu v rôznych koncentráciách (napr. tioflavín T, tiazolová oranž, aktinomycín D).

Kvôli eliminácii chýb pri pipetovaní submikrolitrových objemov je vhodné si pripraviť tzv. mastermix, ktorý bude obsahovať všetky zložky potrebné pre priebeh reakcie PCR okrem DNA a ligandov, ten následne rozpipetujeme do jednotlivých mikroskúmaviek, do ktorých potom samostatne pridáme DNA a ligand.

Pripravené reakčné zmesi potom vložíme do termocykléra, kde prebehne PCR reakcia. V termocykléri prebehne počiatočná denaturácia (95°C, 1 minúta) a 35 cyklov: denaturácia pri 95°C počas 1 minúty, hybridizácia pri 50-60°C počas 1 minúty, elongácia pri 72°C počas 1,5 minúty. Po ukončení všetkých cyklov prebehne záverečná elongácia (72°C, 5 minút) a ochladenie na 12°C.

2.6.2 Využitie PCR na určenie príbuzenstva resp. detekciu HPV

V prípade oboch postupov budeme potrebovať najprv získať templátovú chromozómovú DNA, ktorú získame zo slín. V prípade úlohy určenej na detekciu HPV je potrebné, aby sliny, z ktorých bude extrahovaná DNA, pochádzali od ženy.

Príprava vzoriek templátovej DNA

Vzorky na PCR reakciu budeme pripravovať zo slín, ktoré sú dobrým zdrojom genómovej DNA. Pred odoberaním vzoriek je potrebné vyplachovať ústa po dobu 10-20 sekúnd filtrovanou vodou. Následne 5 minút zbierame sliny v ústach, ktoré následne vypľujeme do sterilnej polypropylénovej tuby. Takto odobraté vzorky môžeme skladovať pri -20 stupňoch až do extrakcie DNA.

Extrakcia chromozómovej DNA zo slín

1. Zo slín odoberieme do mikroskúmavky 500 µL a vzorku centrifugujeme pri 6000 rpm 10 minút.
2. Opatrne odoberieme supernatant a pelet prečistíme rozsuspendovaním v 500 µL roztoku PBS (137 mmol.dm^{-3} NaCl, 27 mmol.dm^{-3} KCl, 100 mmol.dm^{-3} Na_2HPO_4, 2 mmol.dm^{-3} K_2HPO_4).
3. Vzorku centrifugujeme pri 6000 rpm 10 minút, následne odoberieme supernatant a vykonáme lýzu buniek rozsuspendovaním peletu v 500 µL lyzačného tlmivého roztoku (10 mmol.dm^{-3} Tris-HCl pH 8.4, 5 mmol.dm^{-3} EDTA, 200 mmol.dm^{-3} NaCl)
4. Bunkový lyzát inkubujeme 5 min pri 60 ^{o}C v termostate.
5. K roztoku pridáme 25 µL proteinázy K (2 mg/mL) a 5 µL RNázy (10 mg/mL) a inkubujeme 60 min pri 60 ^{o}C v termostate.
6. K zmesi pridáme 250 µL 5M NaCl a vzorku inkubujeme na ľade 5 min.
7. Vzorku centrifugujeme 10 min pri 10000 rpm, supernatant odlejeme a pelet dvakrát premyjeme 500 µL vychladeného 70 % etanolu.
8. Získanú genómovú DNA sušíme vo vákuovej sušičke 10 min a následne produkt rozpustíme v 50 µL roztoku TE [Walsh 1992].

PCR reakcia

Pomôcky a chemikálie: Templátová chromozómová DNA extrahovaná zo slín; priméry (riedené 1:500 až 1:2000) D21S11, Penta E, D18S51, TH01, CSF1PO, D7S820 a D13S317 v prípade testu na určenie príbuzenstva, resp. MY09 a MY11 v prípade testu na detekciu HPV, *Taq* polymeráza, 10x koncentrovaný tlmivý roztok pre *Taq* polymerázu; 2,5 mmol.dm^{-3} dNTP, 25 mmol.dm^{-3} roztok $MgCl_2$; sterilná voda, termocyklér.

Reakciu budeme vykonávať v celkovom objeme 20 µL: 2 µL templátu chromozómovej DNA (zriedený v pomere od 1:100), 2 µL z oboch primérov, 2 µL $MgCl_2$ (25 mmol.L^{-1}), 2 µL dNTP, 2

µL z 10x konc. zásobného tlmivého roztoku pre Taq polymerázu, 8 µL sterilnej vody, 1U *Taq* polymerázy.

Pri príprave vzoriek postupujeme podobne ako pri postupe PCR reakcie z kapitoly 2.6.1, jedinou výnimkou bude, že do jednotlivých vzoriek sa nebude pridávať ligand!

2.6.3 Elektroforetická analýza PCR produktov

Pomôcky a chemikálie: PCR produkty, agaróza, 0.5 x TBE, aparatúra na elektroforézu

Pripravíme si 2 % agarózový gél, do vzoriek pridáme tzv. **nanášací roztok** - loading buffer (0,025 % brómfenolová modrá, 40 % sacharóza). Na začiatok nanesieme porovnávací štandard s fragmentami DNA o známej veľkosti. Po prebehnutí elektroforézy vizualizujeme výsledok ofarbením gélu v roztoku obsahujúcom EtBr a vložením na UV trasilluminátor.

3 Elektroforetické metódy

Elektroforetické metódy sa používajú na separáciu rôznych biologických vzoriek od malých biomolekúl až po bunky, ktoré majú elektrický náboj. Látky musia mať charakter iónov alebo amfolytov [Ferenčík a Škárka 1981]. **Amfolyty** sú látky (napr. proteíny), ktoré majú v dôsledku ionizácie prostredia kladné aj záporné náboje. Pri vysokom pH sa ionizujú kyslé skupiny a častice majú záporný náboj, napr. $H_2N—R—COOH + OH^- \leftrightarrows H_2N—R—COO^- + H_2O$. Pri nízkom pH sa naopak ionizujú zásadité skupiny a celkový náboj molekuly je kladný, $H_2N—R—COOH + H^+ \leftrightarrows H_3N^+—R—COOH$. Medzi týmito limitnými stavmi je taká hodnota pH, pri ktorej sa ionizuje rovnaký počet kyslých aj zásaditých skupín, takže celkový náboj molekuly je nulový. Táto hodnota sa nazýva **izoelektrický bod** (**pI**) a je charakteristickou konštantou pre každý amfolyt. Od izoelektrického bodu závisí aj pohyblivosť amfolytu. Pri pH rovnom pI je rovnováha medzi kladnými a zápornými nábojmi v molekule, preto je jej pohyblivosť v elektrickom poli nulová, pri pH vyššom ako pI má amfolyt záporný náboj a pohybuje sa smerom k anóde, pri pH nižšom ako pI sa amfolyt pohybuje ku katóde. Pre izoelektrický bod bielkovín platí vzťah:

$$aH^+ = \sqrt{\frac{Ka_1 + Ka_2 + \ldots Ka_m}{Kb_1 + Kb_2 + \ldots Kb_n} \bullet K_v}$$

kde a_{H^+} je aktivita vodíkových iónov, Ka_1 až Ka_m sú disociačné konštanty kyslých skupín určitej bielkoviny, Kb_1 až Kb_n sú disociačné konštanty zásaditých skupín, $K_v = 10^{-14}$ je disociačná konštanta vody.

Pretože kyslosť karboxylových skupín je väčšia ako zásaditosť aminoskupín, väčšina proteínov má izoelektrický bod pI = pH = -log a_{H^+} menšiu hodnotu ako 7.

Ak sa zmes takýchto látok vystaví pôsobeniu elektrického poľa, molekuly (častice) sa začnú pohybovať k pólom s opačnou polaritou. Ich pohyblivosť závisí od veľkosti povrchového náboja, veľkosti a tvaru molekúl, podmienok prostredia a intenzity elektrického poľa. Veľkosť náboja molekuly ovplyvňuje stupeň ionizácie, pH a iónová sila prostredia. Elektroforézou sa môžu separovať nízkomolekulové ale aj vysokomolekulové látky ako sú napríklad proteíny a ich komplexy so sacharidmi, lipidmi, nukleotidmi a taktiež rôzne typy nukleových kyselín. Elektroforéza sa vykonáva v prostredí voľného elektrolytu (voľná elektroforéza, kapilárna elektroforéza) alebo v rôznych pórovitých nosičoch, ktoré sú saturované elektrolytom. Elektrolyt je v podstate tlmivý roztok, ktorý sa využíva pri separácii molekúl v eletroforéze. Pri

voľnej elektroforéze sa jednotlivé zložky rozdelia na zóny, ktoré nie sú dokonalo priestorovo oddelené. Ich premiešaniu zabraňuje len vyššia hustota rozdelených látok v porovnaní s elektrolytom. Jednotlivé zóny sa zvyčajne detegujú na základe rozdielnych indexov lomu svetla na ich rozhraní. Pri separácii nízkomolekulových látok sú rozdiely hustôt medzi nimi a základným elektrolytom veľmi malé, čo obmedzuje možnosť použitia voľnej elektroforézy. Tieto ťažkosti odstránilo zavedenie pórovitých nosičov. Okrem toho zariadenia na elektroforézu na nosičoch sú podstatne jednoduchšie, menej nákladné a časovo efektívnejšie. Rozhranie látok rozdelených na nosiči je oveľa stálejšie a dá sa ľahko vizualizovať viacerými metodickými postupmi. Voľná elektroforéza sa preto už prakticky nepoužíva na rozdiel od kapilárnej elektroforézy. Keďže látky rozdelené na nosiči vytvárajú po detekcii dobre viditeľné zóny, táto technika sa často nazýva aj **zónová elektroforéza**.

Z nosičov sa ako prvý použil agarový gél a potom papier. Elektroforéza na agarovom géle sa neskôr nazvala *agaroforéza* a elektroforéza na papieri *papierová elektroforéza*. Ďalšími osvedčenými nosičmi sú: škrob (škroboforéza), agaróza (má výhodnejšie vlastnosti ako agar), dextran (Sephadex), polyakrylamid (PAGE) a i. Elektroforetická separácia sa môže vykonávať v jednom smere alebo v dvoch smeroch (dvojrozmerná elektroforéza), prípadne sa môže kombinovať s chromatografiou (elektrochromatografia).

Základné zariadenie na elektroforézu sa skladá z elektroforetickej komory (kyveta, valec, kolóna) a zdroja jednosmerného alebo pulzného elektrického prúdu. Elektroforetická komora má katódový a anódový priestor, v ktorom sú príslušné elektrolyty a priestor na umiestnenie nosiča. Nosič sa spája s elektrolytmi pomocou vodivých mostíkov. Zdroj jednosmerného elektrického prúdu by mal poskytovať stabilizovaný prúd alebo napätie. Potenciálový spád je napätie na jednotku dĺžky nosiča, vrátane mostíkov, ktorými sa spája nosič s elektrolytom. Napríklad ak je dĺžka nosiča (od hladiny elektrolytu v katódovom priestore po hladinu elektrolytu v anódovom priestore) 25 cm a napätie na svorkách usmerňovača 500 V, potom potenciálový spád je 20 $V.cm^{-1}$. Skutočne nameraný potenciálový spád medzi koncami nosiča je vždy o niečo menší ako teoretický potenciálový spád. Ak sa pri elektroforéze používa potenciálový spád nosiča menší ako 20 $V.cm^{-1}$, jedná sa **nízkonapäťovú** elektroforézu. Pri použití potenciálového spádu 20 až 50 $V.cm^{-1}$ ide o strednonapäťovú elektroforézu a pri použití viac ako 50 $V.cm^{-1}$ ide o vysokonapäťovú elektroforézu.

Elektroforéza je v porovnaní s centrifugáciou a chromatografiou najčastejšie používanou separačnou metódou aj pri manipulácii s nukleovými kyselinami. Ako už bolo spomenuté

vyššie, metóda je založená na separácii molekúl s elektrickým nábojom v pórovitom prostredí. Nukleové kyseliny sú polyanióny s negatívnym nábojom pohybujúce sa ku kladnej anóde. Rýchlosť pohybu molekuly v elektrickom poli, tzv. **elektroforetická pohyblivosť** je funkciou celkového náboja molekuly, molekulovej hmotnosti a je značne závislá od tvaru molekuly, čiže jej konformácie. Fakt, že pohyblivosť molekúl závisí nie len od veľkosti ale aj od ich tvaru, umožňuje použiť túto metodiku aj na sledovanie ich štruktúrnych topologických zmien nukleových kyselín. Elektroforetická pohyblivosť **μ** je vzdialenosť d, ktorú prejde molekula za sekundu pri jednotkovej intenzite elektrického poľa (potenciálový rozdiel jedného voltu na jeden centimeter stĺpca elektrolytu), $\mu = d.E/t$. Rozmer je najčastejšie udávaný v $cm^2/s.V$.

V súčasnosti sa pri elektroforetickej separácii pri analýze nukleových kyselín najviac využívajú najmä agarózové a polyakrylamidové gély [Víglaský a kol. 2000]. Polyakrylamidový gél pri elektroforéze (**PAGE**) bol prvýkrát použitý v roku 1959 Raimondom a Weintraubom. Tento gél bol vytvorený polymerizáciou akrylamidu a N,N´-metyl-bisakrylamidu, ktorý má funkciu priečne spájajúceho komponentu. PAGE sa využíva pri štúdiu proteínov a nukleových kyselín s nižšou molekulovou hmotnosťou. Popularita tohto nosiča je popri jednoduchosti v príprave aj vďaka jeho priehľadnosti, mechanickej stabilite, chemickej inertnosti, stabilite v širokom rozsahu hodnôt pH a jeho nerozpustnosti vo väčšine bežných rozpúšťadiel. Gél môže byť spoľahlivo a reprodukovateľne pripravený z analyticky čistých komerčne dostupných materiálov, ktorých vzájomný pomer má rozhodujúci vplyv na rozličnú hustotu a priemernú veľkosť pórov v géle. Koncentrácia akrylamidu býva v rozsahu od 3 do 30 %, čo umožňuje separovať látky od 10^2 do 10^6 D, čo zodpovedá peptidom o veľkosti rádovo od jednej do 10^2 prípadne až 10^3 aminokyselinových zvyškov a DNA alebo RNA o veľkosti 1-800 nukleotidov.

Pri štúdiu plazmidov a ich štiepnych produktoch ako aj produktoch PCR sa častejšie používa elektroforéza v agarózovom alebo agarovom géle, ktorá je vhodná pre separáciu DNA s rozsahom jej dĺžky 70-20 000 bázových párov (bp). Dlhšie fragmenty sa už pohybujú nezávisle od svojej dĺžky, čo spôsobuje problémy pri separácii a následnej analýze. Pre veľmi veľké DNA molekuly s viac ako 10^6 bp sa používajú elektroforézy s pulzným elektrickým poľom. Pohyblivosť DNA závisí nie len od intenzity poľa, veľkosti molekúl, ale aj od koncentrácie použitého gélu. Mobilita DNA v roztoku nezávisí od veľkosti. Priemerná veľkosť pórov je pri tomto type nosičov ešte väčšia, a preto umožňuje separovať aj látky o molekulovej hmotnosti v rozsahu od 10^2 až 10^5 kD. Agar nie je chemicky jednotná látka, ale je to zmes dvoch polysacharidov agarózy a agaropektínu. Agaróza má viac-menej konštantné zloženie,

preto gél pripravený z čistej agarózy vykazuje v porovnaní s agarovým gélom výrazne menšiu elektroendoosmózu a vyššiu reprodukovateľnosť elektroforetických experimentov. Agar sa ešte aj dnes používa hlavne v imunoelektroforéze a hlavne pri príprave agarových platní určených na kultiváciu mikroorganizmov. Pri väčšine separácii sa používa gél, ktorý obsahuje 0,6 až 1,5 % agarózy.

Pri elekroforetickej separácii sa využívajú elektrolyty, ktorými sú zvyčajne tlmivé roztoky s určitou koncentráciou solí, pH, iónovou silou, nízkou vodivosťou, teplotou, viskozitou atď. Hlavnou funkciou tlmivých roztokov pri elektroforéze je viesť prúd a udržiavať konštantné pH. Schopnosť udržiavať konštantné pH je podmienkou, aby každá látka v delenej zmesi mala počas elektroforézy definovaný náboj. Pri výbere tlmivého roztoku je dôležitá iónová sila roztoku, ktorá má vplyv na veľkosť prúdu počas elektroforézy. Čím väčšiu iónovú silu bude mať roztok, tým väčšiu časť prúdu budú prenášať jeho ióny a ostatné nabité častice sa budú pohybovať v dôsledku tienenia a solvatačného efektu pomalšie. Tento jav je príčinou, že so zvyšujúcou sa koncentráciou tlmivého roztoku sa znižuje pohyblivosť iónov a nabitých častíc. Koncentrácie ionizujúcich solí by mali byť v rozsahu $0{,}2.10^{1}$- 1.10^{2}, pretože neúmerne prispievajú k zvyšovaniu elektrického prúdu a následne dochádza k prehrievaniu elektroforetických gélov. Vhodnosť tlmivého roztoku sa posudzuje aj z hľadiska jeho iónovej stability. V iónovo stabilných tlmivých roztokoch nedochádza k hromadeniu katiónov a aniónov v priestoroch elektród. Vysoké napätie pri časovo dlhších experimentoch spôsobuje hromadenie sa H^{+} katiónov v oblasti katódového priestoru a pH gradient môže mať negatívny vplyv na kvalitu delenia. Tomuto javu je možné zabrániť cirkuláciou tlmivého elektródového roztoku z katódového priestoru do anódového a naopak pomocou peristaltických púmp. Jednotlivé zložky tlmivého roztoku by nemali interagovať s delenou látkou. Do týchto tlmivých roztokov sa môžu pridávať rôzne chemické činidlá, cielene interagujúce so skúmanou látkou, pri ktorých sa sleduje ich vplyv na elekroforetickú pohyblivosť, prípadne môžu zlepšovať separáciu látok (napr. močovina čiastočne rozvinie polypeptidové reťazce, EtBr relaxuje superhelikálnu štruktúru DNA do kruhovej formy). EtBr sa hlavne používa ako fluorescenčná sonda pri štúdiu nukleových kyselín, pretože umožňuje ich vizualizáciu po ožiarení UV svetlom.

3.1 Faktory ovplyvňujúce elektrickú pohyblivosť

Čím je potenciálový spád väčší (čím je väčšie napätie), tým rýchlejšie sa častica pohybuje. Pohyblivosť častíc ovplyvňujú viaceré faktory. Reprezentujú ich vlastnosti častíc, prostredia, nosiča a elektrického poľa.

1. **Fyzikálnochemické vlastnosti samotných častíc** – ich celkový náboj, veľkosť, tvar, disociovateľnosť povrchových skupín, schopnosť adsorpcie iónov a polárnych molekúl, tvorba komplexov a pod. Viaceré z týchto vlastností, vrátane celkového náboja ovplyvňuje disperzné prostredie, najmä pH a prítomnosť iných elektrolytov.

2. **Vlastnosti prostredia.** Elektroforéza sa vykonáva v elektrolytoch, ktorými sú zvyčajne tlmivé roztoky s určitou koncentráciou solí, pH, iónovou silou, vodivosťou, teplotou, viskozitou a dielektrickou konštantou. Pohyblivosť častíc môžu ovplyvňovať aj prítomné neelektrolyty (tvorba komplexov a agregátov). Hlavnou funkciou tlmivého roztoku je prenášať prúd a udržovať konštantné pH, čo je podmienkou, aby každá látka z delenej zmesi mala počas elektroforézy ten istý náboj. Prúd prenášajú ióny, preto čím bude mať tlmivý roztok vyššiu iónovú silu (I), tým väčšiu časť prúdu budú prenášať jeho ióny a ostatné prítomné ióny sa budú o to pomalšie pohybovať. Okrem toho pohyb iónov obalených iónmi opačného náboja sa ich vzájomnou príťažlivosťou spomaľuje. Tieto dva javy sú príčinou, že so zvyšujúcou sa koncentráciou tlmivého roztoku sa znižuje aj pohyblivosť (migrácia) iónov a nabitých častíc.

Roztok elektrolytu je vodičom druhej triedy, a preto pri prechode prúdu kladie odpor, ktorého prevrátená hodnota je vodivosť. Odpor elektrolytu závisí od jeho druhu, koncentrácie a konštrukcie zariadenia, v ktorom sa uskutočňuje elektroforéza. Pri prechode prúdu vzniká Jouleovo teplo Q.

$$Q = E.I.t = \frac{E^2.t}{R},$$

kde E je napätie [V], I je prúd [A], t je čas [s] a R je odpor [Ω]. Tento vzťah vyjadruje závislosť vodivosti od Jouleovho tepla, čím je vodivosť väčšia, faktor 1/R, tým je väčšie aj Jouleovo teplo. Vzniknuté teplo zapríčiňuje viacero negatívnych javov. Napríklad odparovanie rozpúšťadla počas elektroforézy, čím sa zahusťuje elektrolyt a zväčšuje sa jeho vodivosť a zmeny vo veľkosti pórov v elektroforetickom géle. Pri konštantnom napätí sa preto s časom zvyšuje prúd, a tým aj rýchlosť migrácie nabitých častíc. Ak je prúd konštantný, znižuje sa napätie (Ohmov zákon). Tieto zmeny nie sú pri nízkonapäťovej elektroforéze výrazne, avšak pri vysokonapäťovej elektroforéze sa s nimi musí počítať. Pôsobením Jouleovho tepla sa zahrieva aj nosič s deliacimi sa látkami, ktoré sa môžu účinkom tepla denaturovať alebo ináč pozmeniť.

Produkcia Jouleovo tepla sa dá znížiť napríklad znížením iónovej sily tlmivého roztoku, čo sa do istej miery využíva aj pri papierovej elektroforéze, znížením napätia (znížením potenciálového spádu na polovicu sa vznikajúce teplo zníži na štvrtinu, Jouleovo teplo závisí od štvorca napätia) alebo odvádzaním tepla pomocou chladiacich aparatúr rozličnej konštrukcie. Táto možnosť je najvýhodnejšia, lebo sa dá použiť takmer pri všetkých typoch komerčne dostupných elektroforéz. Pri analytickej elektroforéze sa zvyčajne porovnávajú pohyblivosti látok a častíc vo viacerých komôrkach nosiča. Ak sa používa konštantné napätie, nastaví sa hodnota vo voltoch na začiatku elektroforézy. Ak sa elektroforéza robí pri konštantnom prúde, musí sa hodnota v miliampéroch nastaviť podľa počtu komôrok, prípadne podľa šírky nosiča (gélu). Konštantný prúd alebo konštantné napätie sa musí udržovať preto, aby sa počas elektroforézy nemenili podmienky separácie. Pri elektroforéze na papieri alebo na acetáte celulózy vzniká pomerne málo tepla, a preto uspokojivé rozdelenie väčšiny látok sa dosiahne bez ohľadu na to, či sa udržiava konštantná hodnota napätia alebo prúdu. Ak sa elektroforéza robí v gélových nosičoch, ktorých hrúbka je 2 až 10 mm, Jouleovo teplo sa stáva problémom. V tomto prípade je výhodnejšie použiť konštantný prúd. S pribúdajúcim časom sa zmenšuje napätie a znižuje sa Jouleovo teplo. Konštantný prúd sa používa aj pri papierovej elektroforéze, ak sa merajú pohyblivosti iónov alebo amfolytov.

3. **Vlastnosti nosiča.** Pohyblivosť nabitých častíc je na nosičoch zvyčajne nižšia ako pri voľnej elektroforéze. Ich migráciu ovplyvňujú ďalšie faktory: elektroendoosmóza, prietokový potenciál, priestorové vplyvy nosiča, adsorpcia atď. Veľkosť *elektroendoosmózy* závisí najmä od druhu nosiča, potenciálového spádu, iónovej sily elektrolytu a pH. Vplyvom elektroendoosmózy sa častice spolu s prúdom vody unášajú smerom ku katóde. Výsledný pohyb častice je súčtom elektroforetickej a elektroendoosmotickej pohyblivosti. Napríklad pri papierovej elektroforéze sérových proteínov môžu sa gama-globulíny pohybovať smerom ku katóde, hoci majú záporný náboj. Zapríčiňuje to elektroendoosmóza. Korekcia na elektroendoosmotický pohyb sa dá urobiť tak, že sa odmeria pohyb nenabitých častíc alebo molekúl. Na tento účel sa používajú viaceré látky, najviac sacharidy (dextrán). Korekcia je však presná len vtedy, ak veľkosť a tvar nenabitej molekuly je podobný molekule, ktorej pohyblivosť sa má odmerať. **Prietokový potenciál** vzniká pri pohybe vody cez nosič a má opačný smer ako smer pohyblivosti vzoriek. Má teda na migráciu častíc brzdiaci účinok.

Pohyb častíc ovplyvňuje aj *priestorová štruktúra nosiča.* Pri papierovej elektroforéze sa napr. ukázalo, že elektroforetický pohyb častice nie je priamy, ale cikcakovitý. Častica takto prejde oveľa väčšiu dráhu ako je skutočná dĺžka medzi štartom separácie a konečným

miestom. Predĺženie dráhy migrujúcej častice sa vysvetľuje zakrivením pórov alebo bariérovým účinkom vlákien celulózy. *Bariérový účinok* sa zakladá na tom, že pohybujúca sa častica naráža na molekuly nosiča, čím dochádza k spomaleniu jej pohybu. Nosiče na báze gélu majú rozličný stupeň vnútorného sieťovania, a tým aj rôznu veľkosť pórov. Okrem bariérového účinku sa uplatňuje *molekulovo-filtračný účinok* a pri niektorých (agar) aj *ionexový účinok*. Adsorpcia častíc sa v rozličnej miere pozoruje pri všetkých nosičoch. Väčšinou ide o reverzibilnú adsorpciu, ale časť deleného materiálu sa môže adsorbovať aj ireverzibilne (najmä pri papierovej elektroforéze). Štruktúrne vplyvy nosiča sú príčinou, že pohyblivosti viacerých častíc sú na nosičoch aj po odrátaní elektroendoosmotického pohybu ešte stále menšie ako pri voľnej elektroforéze.

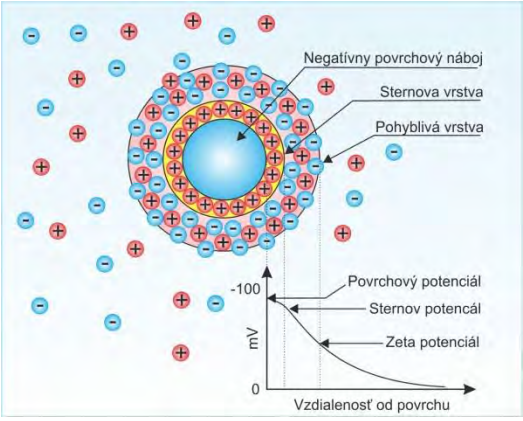
Podmienky, ktoré ovplyvňujú pohyblivosti látok na nosičoch, sú pomerne zložité a ťažko sa dajú štandardizovať. Z uvedeného dôvodu sa na identifikáciu zložiek rozdelených pri elektroforéze nevyužívajú ich absolútne pohyblivosti, ale pomerné pohyblivosti, ktoré sa určia pomocou známych štandardov.

4. **Vlastnosti elektrického poľa** – sila elektrického poľa, jeho homogénnosť, stabilita, zmeny pH vplyvom elektrických dejov na elektródach a komplikácie s Jouleovým teplom. Všetky tieto faktory ovplyvňujú rýchlosť migrácie, ostrosť a rovnomernosť rozdelených zón.

3.2 Náboj koloidných častíc a nanočastíc

Makromolekuly sú koloidné častice a najnovšie aj synteticky pripravené nanočastice, rozptýlené v roztoku elektrolytu, získavajú elektrický náboj nasledujúcimi spôsobmi: ionizáciou povrchových skupín (-NH2, -COOH), adsorpciou aniónov alebo katiónov z roztoku a orientáciou naadsorbovaných polárnych molekúl. Náboj, ktorý takto vzniká na povrchu častice, priťahuje opačne nabité ióny. Tým sa vytvára Helmholtzova elektrická dvojvrstva. Ak je povrch častice nabitý záporne, obalí sa vnútornou nepohyblivou vrstvou kladne nabitých iónov a táto vrstva sa obalí ďalšími kladne nabitými iónmi, ktoré predstavujú vonkajšiu vrstvu. Vo vonkajšej vrstve sa smerom od častice znižuje koncentrácia iónov a zvyšuje sa jej pohyblivosť. Keď povrch častice získa kladný náboj, obidve obalové vrstvy majú záporný náboj. Potenciál medzi povrchom častice a homogénnym roztokom sa nazýva elektrochemický alebo *epsilonový potenciál (ε)*, ktorý sa rozdeľuje na ostro ohraničený *Sternov potenciál* medzi povrchom častice

a pohyblivou vrstvou a na difúzny elektro-kinetický potenciál alebo *potenciál Zeta (ξ)* medzi nepohyblivou vrstvou a homogénnym roztokom, Obr. 6.



Obr. 6. Elektrochemický potenciál medzi povrchom častice a homogénnym roztokom.

Ak nabitá častica putuje roztokom elektrolytu pôsobením elektrického poľa, jej rýchlosť závisí od elektro-kinetického potenciálu. Potenciál Zeta je príčinou aj iných elektro-kinetických javov, ako je elektroendoosmóza, prietokový potenciál a Dornov efekt. Z nich sa pri elektroforetických metódach uplatňuje najmä elektroendoosmóza a to hlavne v agarových géloch. Jej podstatou je pohyb častíc a molekúl vody do katódového priestoru. Príčinou je migrácia hydratovaných katiónov v difúznej časti elektrickej dvojvrstvy, kým anióny sa adsorbujú v pórovitom nosiči. V sklených kapilárach získava voda kladný náboj, a preto sa pohybuje smerom ku katóde, zapríčiňuje to pravdepodobne väčšia adsorpcia hydroxylových aniónov na stenu kapiláry.

Veľkosť častíc ale aj Zeta potenciálu umožňuje meranie pomocou dynamického rozptylu svetla na Zeta-Sizeri. Niekedy je vhodné elektoforetickú separáciu kombinovať s týmto experimentálnym prístupom.

3.3 Papierová elektroforéza

Papierová elektroforéza sa prevádza v nízkonapäťovom aj vysokonapäťovom režime. Pri nízkovoltovom usporiadaní sa používajú rozličné modifikácie klasickej *vlhkej komory*, ktorú tvorí uzavretá nádoba s otvárateľným vrchnákom (*elektroforetická kyveta*), v ktorej sú tri

priestory – katódový, anódový a priestor na uloženie papierových pásov, na ktorých sa delia zmesi iónov a amfolytov. Vysokovoltová papierová elektroforéza si vyžaduje chladenie. Papier sa počas elektroforézy ponorí do nevodivej kvapaliny (toluén, hexán, chlórbenzén a pod.) alebo sa vsunie medzi dve elektricky izolované a chladené platne zo skla, kovu alebo plastov. Nízkonapäťová papierová elektroforéza sa používa pri elektroforéze sérových bielkovín, aj keď v ostatnom čase sa papier nahrádza inými nosičmi s výhodnejšími vlastnosťami. Vysokonapäťová elektroforéza sa používa zriedkavo pri separácii aminokyselín, peptidov, sacharidov, alkaloidov, vitamínov a iných nízkomolekulových látok.

Postup papierovej elektroforézy má päť základných operácií: príprava papiera, aplikácia vzorky, samotná elektroforéza, detekcia rozdelených zložiek a ich kvantitatívne stanovenie

3.4 Elektroforéza na acetylcelulóze

Pracovný postup pri tejto elektroforéze sa podobá postupu pri papierovej elektroforéze. Acetylcelulóza má v porovnaní s papierovou elektroforézou viaceré výhody: pásiky acetylcelulózy sa dajú použiť priamo bez osobitnej prípravy a vlhká acetylcelulóza je pevnejšia ako iné nosiče, preto sa s ňou dobre manipuluje. Na acetylcelulózu sa dá naniesť veľmi malé množstvo vzorky, a preto sa môže robiť v mikromeradle. Čas elektroforetickej separácie je kratší ako pri papierovej elektroforéze, hranice rozdelených zón jednotlivých zložiek sú ostrejšie. Na acetylcelulóze sa dajú deliť aj také proteíny, ktorých separácia sa pri papierovej elektroforéze nedá dosiahnuť (napr. inzulín, lyzozým). Delenie sérových proteínov niektorých zvierat (potkan, myš) je lepšia na acetylcelulóze ako na papieri. Acetylcelulóza je komerčne dostupná aj vo forme hotových gélov s rozličnou hrúbkou a rozmermi. Elektroforéza na acetylcelulózových membránach sa dá robiť aj v kyvetách určených na elektroforézu v agarózovom géle, vrátane imunoelektroforézy. Obidve tieto techniky sa dajú uskutočniť v zariadeniach na acetylcelulózovú elektroforézu.

Elektroforéza na acetylcelulóze sa využíva pri delení proteínov z krvného séra, mozgovo-miechového moku, moču, tkanivových extraktov a iných materiálov. Pomocou tejto techniky sa dajú deliť aj enzýmy, lipoproteíny, glykoproteíny, polysacharidy a iné látky. Acetylcelulózové

membrány sa uplatnili aj pri imunodifúznych technikách a imunoelektroforéze, avšak na tento účel je podstatne vhodnejší agarový alebo agarózový gél.

3.5 Elektroforéza v škrobovom géle

Elektroforéza v géloch , či už v škrobovom, agarózovom alebo polyakrylamidovom sa líši od elektroforézy na papieri alebo acetylcelulózových membránach v tom, že zložky nanesenej zmesi sa delia nielen podľa veľkosti svojho náboja, ale aj podľa veľkosti svojich molekúl. Tieto gély majú charakter molekulových sít, čo umožňuje, aby sa pri elektroforéze rozdelili aj také látky, ktoré majú rovnaký náboj, ale rozličnú veľkosť molekúl. Tým sa podstatne zvyšuje deliaca schopnosť metódy. Napríklad bielkoviny ľudského séra sa pri elektroforéze na papieri alebo na acetylcelulóze rozdelia len na šesť frakcií, kým pri elektroforéze na škrobe na 18 až 27 frakcií (podľa koncentrácie škrobu a použitého elektrolytu). Škroboforéza sa môže robiť aj v prítomnosti močoviny, čo umožňuje separovať izolované polypeptidové reťazce. Dá sa robiť v horizontálnej alebo vertikálnej polohe, lepšie delenie sa dosahuje pri vertikálnom usporiadaní.

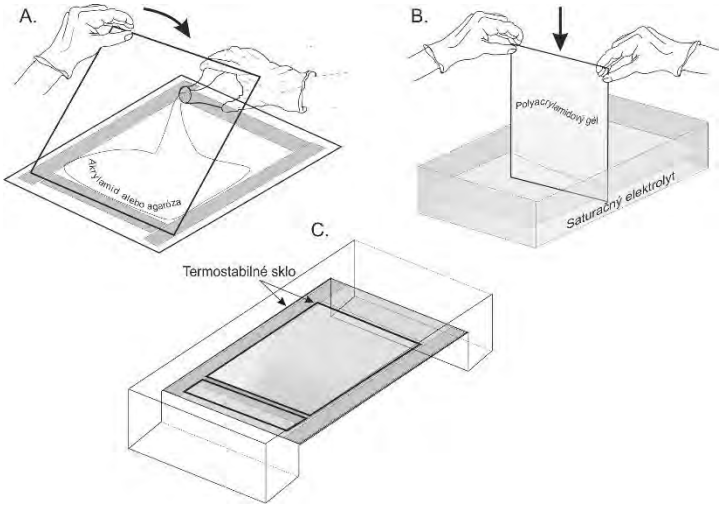
Elektroforézu na škrobovom géle možno vykonávať v jednom alebo v dvoch rozmeroch (dvojrozmerná škroboforéza). Okrem analytického stanovenia látok sa dá využiť aj na preparatívne účely. V ostatnom čase sa pri elektroforetických separačných technikách škrobový gél, až na niektoré výnimky, nahradil polyakrylamidovým gélom. Príčinou sú najmä ťažkosti so štandardizáciou škrobového gélu a s kvantitatívnym hodnotením rozdelených zložiek, jeho krehkosť (zlá manipulácia) a v určitých smeroch aj obmedzené použitie.

3.6 Elektroforéza v agarózovom géle

Komerčný agar, ktorý sa získava extrakciou z morských chalúh (*Gelidium amansii*) nie je vhodný na prípravu gélu na elektroforézu. Na tento účel sa využíva špeciálne vybielený agar. Agar nie je chemicky jednotná látka, je to zmes dvoch polysacharidov – agarózy a agaropektínu. Agaróza je polymér disacharidu agarobiózy, ktorá sa skladá z D-galaktózy a 3,6-

dehydro-L-galaktózy. Agaropektín obsahuje okrem týchto dvoch monosacharidov aj ďalšie, ako kyselinu glukurónovú a pyrohroznovú a je bohatý na karboxylové a sulfátové skupiny, ktoré mu dodávajú aj ionexové vlastnosti. Ich obsah sa pri rôznych druhoch agaropektínu líši, napr. koncentrácia síranových skupín je 0,3 - 3,7 %. Agaróza má konštantné zloženie. Okrem toho gél pripravený z čistej agarózy má v porovnaní s agarovým gélom menšiu elektroendoosmózu a nezrážajú sa v ňom niektoré bázické proteíny, napr. lyzozým. Z uvedených príčin sa na elektroforézu, ale aj pri imunodifúznych technikách, používa väčšinou už len agarózový gél. Agaróza má nízku elektroendoosmózu. Príprava gélu je nenáročná a rýchla.Gél je priehľadný, separované zložky sa ľahko detegujú a má dobré mechanické vlastnosti.

Agaróza na prípravu gélu sa rozpúšťa priamo v tlmivých roztokoch. Homogénne rozpustenie sa dosahuje krátkodobým ohrevom tesne pod teplotu varu. Ak teplota pri ochladzovaní dosiahne 45 °C, vzniká polotuhý gél, roztok však musí obsahovať aspoň 0,2 % agarózy, Obr. 7.



Obr. 7. Znázornenie nalievania gélov do predpripravených foriem elektroforetickej aparatúry.

Papierové alebo acetylcelulózové nosiče sa pri elektroforéze zvyčajne nahrádzajú 0,5 až 1,0 % agarózovým gélom, pričom delenie nízkomolekulových i vysokomolekulových látok je kvalitnejšie a jednotlivé zóny sú ostrejšie. Póry, ktoré sa vytvoria v agarózovom géle, sú pomerne veľké, takže pri delení bežných makromolekúl sa ešte neuplatňuje molekulovo filtračný účinok. V dôsledku toho sa napr. ľudské sérové bielkoviny delia iba na 6 až 7 frakcií – podobne ako pri elektroforéze na acetylcelulóze. Molekulovo filtračný účinok sa však uplatňuje

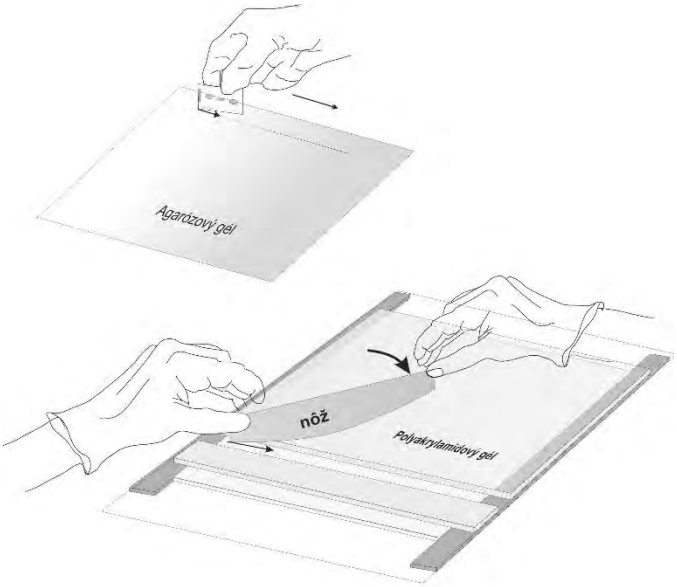
pri veľkých makromolekulách (komplexy niekoľkých enzýmov), subcelulárnych časticiach a vírusoch. Na delenie takýchto látok a častíc je agarózový gél vhodnejší ako polyakrylamidový.

Pri väčšine separácií sa používa gél, ktorý obsahuje 0,5 až 1,5 % agarózy. Pripravuje sa priamo rozpustením práškovej agarózy vo vhodnom horúcom tlmivom roztoku. Do horúceho roztoku agarózy sa môže pridať 0,1 % azid sodný alebo 0,01 % mertiolát ako bakteriostatická látka. Ak sa komerčná agaróza rozpúšťa pomalšie, odporúča sa z nej pripraviť dvakrát koncentrovanejší roztok, ktorý sa rozpipetuje do skúmaviek a nechá sa stuhnúť alebo sa gél po stuhnutí rozreže na malé kocky. Takýto zásobný gél sa môže uskladňovať dlhý čas v chladničke. V prípade potreby sa pomerne rýchlo vo vodnom kúpeli rozpustí a pridá sa k nemu rovnaký objem tlmivého roztoku s teplotou 50 °C, čím sa agaróza upraví na potrebnú koncentráciu. Horúca zmes sa vyleje na elektroforetickú platňu, kde po stuhnutí vznikne gél. Platňa sa musí pred vyliatím horúceho roztoku agarózy odmastiť a umiestniť na vodorovnú podložku, aby celá plocha gélu mala rovnakú hrúbku.

Agarózové gély sa pripravujú v rôznych tlmivých roztokoch (citrát-fosfát, Tris-HCl, Tris-Tricin, Tris-kyselina boritá-EDTA, Tris-kyselina octová-EDTA). Ich koncentrácia je 0,05 až 0,1 $mol.L^{-1}$, iónová sila 25 až 50 $mmol.L^{-1}$ a pH 7,6 až 8,6.

Vzorka sa nanáša do okrúhlych alebo podlhovastých jamiek, ktoré sa buď vyrezávajú alebo priamo odlievajú pomocou hrebeňa, Obr. 8. Odporúča sa, aby sa jamky naplnili roztokom vzorky až po okraj a aby sa vzorka (ak ide o čistú bielkovinu, použije sa asi 0,3 až 0,5 % roztok) pripravila v tlmivom roztoku, ktorého pH je vyššie a iónová sila nižšia ako má tlmivý roztok v elektródových nádobkách. Dosiahne sa tým lepšie zaostrenie zón. Pri elektroforéze bielkovín a nukleových kyselín sa používa napätie 10 až 20 $V.cm^{-1}$, prúd asi 2 $mA.cm^{-1}$, čas delenia je 1 až 7 hodín.

Niektoré látky, napr. antigény pri imunoelektroforéze alebo enzýmy sa detegujú v natívnom géle, teda bez fixácie a vysušenia. Pri detekcii enzýmovej aktivity sa gél určitý čas vopred inkubuje so substrátom, ktorý je rozpustený vo vhodnom tlmivom roztoku. Zo substrátu môže vznikať farebný produkt, ktorý potom označí polohu enzýmu, alebo sa farebná reakcia musí vyvolať pridaním ďalších reagencií. Rádioaktívne zložky sa dajú detegovať autorádiograficky. Kvantitatívna analýza rozdelených pásov sa vykonáva denzitometrickou analýzou.



Obr. 8. Schematický nákres prípravy žliabku, ktorý je určený na nanášnie elektroforetickej vzorky.

3.7 Polyakrylamidová gélová elektroforéza - PAGE

Polyakrylamidový gél má výhodu v tom, že sa dá ľahko pripraviť, má veľmi dobré mechanické vlastnosti, je priehľadný, neobsahuje nabité skupiny, umožňuje široký rozsah požadovanej veľkosti pórov. Príprava gélu je reprodukovateľná, má nízku adsorpciu a nízku elektroendoosmózu a zo všetkých nosičov má najväčšiu rozlišovaciu kapacitu. Napríklad proteíny ľudského séra sa v ňom pri elektroforéze rozdelia na 25 až 35 frakcií.

Polyakrylamidový gél vzniká polymerizáciou voľných radikálov vytvorených zo základného akrylamidového monoméru (CH_2=CH-CO-NH_2) a sieťovacieho monoméru N,N´-metylén-bisakrylamidu (CH_2=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2), (***Bis***). Obidva základné monoméry, t.j. akrylamid a Bis sú toxické už aj pri dotyku s pokožkou, preto treba s nimi opatrne manipulovať! Polymér nie je toxický. Z akrylamidu vznikajú pri polymerizácii dlhé vlákna, ktoré sa priečne viažu pomocou *Bis-u*, čím vzniká sieť. Veľkosť pórov je nepriamoúmerná koncentrácii akrylamidu. To znamená, že čím je väčšia koncentrácia akrylamidu, tým sú menšie póry. Ukázalo sa, že pri sieťovadle *Bis* je táto závislosť odlišná. Najmenšie póry vznikajú vtedy, keď polymerizačná zmes obsahuje 5 % *Bis-u* (vzhľadom na celkové množstvo akrylamidu). Ak je koncentrácia *Bis-u* väčšia alebo menšia, vzniknú póry s väčším priemerom. Pri príprave

polyakrylamidových gélov je preto koncentrácia *Bis-u* 1 až 5 %. Veľkosť pórov v 6,5 až 20 % polyakrylamidových géloch, ktoré obsahujú 2 až 5 % *Bis-u*, je 4,0 až 0,6 µm.

Na elektroforetické delenie proteínov, nukleových kyselín a iných amfolytov s rôznymi relatívnymi molekulovými hmotnosťami M_r a globulárnou štruktúrou molekuly sa používajú tieto koncentrácie akrylamidu:

% akrylamidu	M_r amfolytu
15 až 30	menej ako 10 000
12	10 000 až 90 000
7,5	30 000 až 150 000
4	90 000 až 1 000 000

Na iniciáciu polymerizačnej reakcie je potrebný katalytický redoxný systém, ktorý môže poskytovať voľné radikály. Zvyčajne sa používa *TEMED* (N,N,N´,N´-tetrametyléndiamín), ako katalyzátor. Persíran amónny slúži ako donor voľných kyslíkových radikálov, tzv. iniciátor. Polymerizácia akrylamidu v prítomnosti TEMEDu a persíranu amónneho je pri laboratórnej teplote rýchla, obyčajne do 5 minút. Proteíny, predovšetkým v natívnych PAGE sú veľmi citlivé na prítomnosť nezreagovaného persíranu aj TEMEDu, preto je vhodné používať ich v čo najmenších koncentráciách aj za cenu, že sa čas polymerizácie gélu predĺži. Polymerizáciu gélu možno spomaliť uchovávaním reagujúcich zložiek v ľadovom kúpeli. V praxi to však nie je potrebné, pokiaľ sa nepoužíva príliš alkalické prostredie. Rýchlosť polymerizácie gélu sa výrazne spomaľuje aj so znižovaním pH. Ďalším známym zdrojom kyslíkových radikálov je *riboflavín*. Fotochemický rozklad riboflavínu, pri ktorom vznikajú voľné radikály, sa iniciuje ultrafialovým (UV) svetlom. Polymerizácia akrylamidu pomocou riboflavínu sa odporúča vtedy, keď sa pripravujú gély s nízkou iónovou silou (napr. pri izoelektrickej fokusácii), lebo je efektívna už pri koncentráciách nižších ako 1 mg riboflavínu v 100 mL roztoku.

Reprodukovateľnosť PAGE v rozhodujúcej miere závisí od reprodukovateľnosti polymerizačnej reakcie, ktorá závisí od vysokej čistoty obidvoch monomérov a katalyzátora. Nevýhodné zmeny v elektroforetickom správaní sa látok vznikajú najmä vtedy, keď akrylamid obsahuje nečistoty (napr. kyselinu akrylovú). Polymerizáciu inhibujú aj nízke koncentrácie kovov. Na prípravu gélov sa preto musia používať len zložky s dostatočnou čistotou. Dobré skúsenosti experimentátorov sú s akrylamidom, *Bis*, TEMED a ďalšími potrebnými chemikáliami od firiem, ako sú napríklad Bio-Rad, Merck, Sigma-Aldrich.

Pri detekcii alebo kvantitatívnom určení množstva jednotlivých zložiek rozdelených pri elektroforéze je potrebné vykonať elúciu zložky z príslušnej zóny (napr. ak sa má odmerať rádioaktivita pomocou scintilačného rádiometra, koncentrácia proteínov, určiť sekvencia monomérnych jednotiek a pod.). Elúcia sa vykonáva pravidelne po preparatívnej elektroforéze. Často sa zjednoduší a urýchli vyrezaním príslušnej zóny a rozpustením polyakrylamidového gélu. Polyakrylamidový gél sa dá rýchlo rozpustiť, ak sa namiesto *Bis*-u použijú iné sieťovadlá, ako *BAC*, *DHEBA*, alebo *DATB*. BAC (N,N´-bisakrylcystamín) je disulfidový analóg Bis: CH_2=CH-CO-NH-CH_2-CH_2-S-S-CH_2-CH_2-NH-CO-CH=CH_2. Gélové odrezky sa dajú solubilizovať aj pridaním 0,1 mL 2-merkaptoetanolu na každý gram gélu. DHEBA (N,N´-dihydroxyetylén-bisakrylamid) obsahuje 1,2-diolovú konfiguráciu:

CH_2=CH-CO-NH-CH-CH-NH-CO-CH=CH_2, ktorá je citlivá na kyselinu jodistú.
| |
OH OH

DATD (N,N´-dialyltartardiamín) má taktiež 1,2-diolovú konfiguráciu:

CH_2=CH-CH_2-NH-CO-CH-CH-CO-NH-CH_2-CH=CH_2.
| |
OH OH

Bis sa nahradzuje DATD v mólových pomeroch a takto pripravený gél sa rozpustí po 30 minútovej inkubácii s 2 % kyselinou jodistou pri teplote miestnosti. Gély s priečnymi reťazcami vytvorenými DATD sa osobitne hodia na izoelektrickú fokusáciu a izotachoforézu.

3.8 Najčastejšie používané typy PAGE

Separácia v polyakrylamidovej elektroforéze sa vykonáva v jednom alebo v dvoch smeroch, tzv. jednorozmerná alebo dvojrozmerná elektroforéza. Pri dvojrozmernom usporiadaní sa môžu kombinovať aj dve rôzne techniky, napríklad v jednom rozmere sa robí natívna elektroforéza a v druhom rozmere elektrofokusácia. Okrem toho pri každom rozmere sa dá použiť iný gél, napr. v jednom agaróza a v druhom polyakrylamid.

Polyakrylamidový gél sa pripravuje vo forme platní na sklách s rozličnými rozmermi alebo vo forme stĺpikov (valčekov) v sklenených rúrkach. Pri mikrotechnikách sa namiesto rúrok používajú kapiláry a pri preparatívnej izolácii látok zasa sklenené kolóny. Platne môžu byť

počas elektroforézy vo vertikálnej alebo horizontálnej polohe. Kapiláry a rúrky sa používajú len pri analytickej elektroforéze, kým platne pri analytickej i preparatívnej elektroforéze.

Podľa štruktúry a zloženia gélu, vlastností tlmivých roztokov a elektrických podmienok sa rozlišujú tieto typy PAGE:

1. **Natívna PAGE** je veľmi podobná agarózovej elektroforéze. Používa sa pri nej polyakrylamidový gél s homogénnym zložením, v ktorom sa látky delia na základe náboja a veľkosti svojich molekúl. Na rozdiel od agarózy sa pri natívnej PAGE v podstatne väčšej miere uplatňuje efekt molekulového sieťovania.

2. **PAGE separácia len na základe veľkosti molekúl**

a) **SDS PAGE** v prostredí dodecylsíranu sodného. Dodecylsíran sodný – SDS (z anglického názvu sodium dodecyl sulphate) sa viaže na peptidové väzby a zásadité skupiny proteínov, v dôsledku čoho všetky proteíny získajú približne rovnako veľký záporný náboj a pri elektroforéze sa potom delia len podľa veľkosti svojich molekúl. SDS sa dá použiť aj na separáciu podjednotiek alebo jednotlivých reťazcov z komplexnej molekuly proteínov (napr. ľahkých a ťažkých reťazcov imunoglobulínov), pretože zabraňuje ich opätovnej asociácii. Rovnaký cieľ sa dá dosiahnuť aj pomocou močoviny, deoxycholátu a Tritonu X-100. Polyakrylamidová elektroforéza v prostredí SDS sa používa najmä pri rýchlom a jednoduchom určení relatívnych molekulových hmotností proteínov.

b) **Elektroforéza v gradientovom géle** v smere intenzity elektrického poľa. Prevádza sa v géle, v ktorom sa v smere migrácie delených zložiek zvyšuje jeho hustota, koncentrácia akrylamidu stúpa, póry sa zmenšujú. Pri prechode z redšieho do hustejšieho gélu pomalšie molekuly dobiehajú rýchlejšie molekuly, pretože zvyšujúca sa hustota gélu im kladie väčší odpor. So zväčšujúcou sa hustotou sa tento odpor stále zväčšuje, až sa gél pri určitej koncentrácii stane nepriestupným. Táto koncentrácia a miesto, kde molekula dorazí, závisí od veľkosti a tvaru migrujúcich molekúl. Po dostatočne dlhom čase takmer všetky molekuly zo vzorky sa dostanú na miesta nepriestupnosti, kde sa zastavia a ich zóna sa zaostrí. Zaostrovanie zón pri prechode pohybujúcich sa molekúl z redšieho do hustejšieho gélu, čiže diskontinuita gélu, sa v praxi často využíva. Vtedy sa hovorí o diskontinuálnej alebo, len krátko diskovej, elektroforéze. Dôležité je ale uvedomiť si, že len molekuly s určitým nábojom sa môžu pobybovať v smere príslušnej elektrickej intenzity. Pokiaľ by bol náboj molekuly nulový alebo opačný pri danom pH elektrolytu, tieto molekuly majú tendenciu migrovať na opačnú stranu.

3. **Disková elektroforéza.** Jej princíp je v zaostrovaní zón vplyvom diskontinuity elektroforetického prostredia a prúdových podmienok. Okrem už uvedeného gradientu hustoty nosičového gélu, sa v praxi využíva najmä gradient pH a gradient vodivosti (tlmivé roztoky s rôznym zložením a iónovou silou). Zmena v kontinuite (diskontinuita) niektorého z uvedených parametrov zapríčiní náhle zabrzdenie pohybu delených zložiek, pri ktorom vzdialenejšie molekuly môžu dobehnúť molekuly putujúce na čele zóny. Tým sa zóna neustále zaostruje.

4. **Izoelektrická fokusácia.** Je to v podstate diskontinuálna elektroforéza v prostredí gradientu pH. Gradient pH sa v géle vytvára prirodzene, pretože pri elektrolýze vody sa na katóde vybíjajú ióny H^+ a na anóde ióny OH^-. V dôsledku toho sa pH smerom k anóde znižuje a smerom ku katóde zvyšuje. Tlmivý roztok ruší vznik takéhoto gradientu. Ak sa priamo do gélu pridá zmes amfolytov, ktoré majú rozličné izoelektrické body pokrývajúce požadovanú oblasť pH, gradient pH sa môže stabilizovať. Každý amfolyt sa potom pri elektroforéze pohybuje podľa svojho náboja až do miesta, kde je rovnaké pH ako jeho izoelektrický bod. Tu zostáva bez náboja a utlmuje všetky nárazy, ktoré chcú zmeniť pH, ktoré vzniklo v tejto lokalite prirodzeným spôsobom. Tým sa vytvára stabilný gradient pH, v ktorom sa separované molekuly bez ohľadu na miesto svojho štartu pri elektroforéze pohybujú do miesta im zodpovedajúceho izoelektrického bodu, kde sa ich zóny zaostrujú. Pri izoelektrickej fokusácii sa vplyvom amfolytových nosičov, ktoré účinkom elektrického potenciálu putujú do miest svojich izoelektrických bodov, vytvára medzi anódou a katódou stály gradient pH. Gradient sa vždy tvorí od okrajov gélu do jeho stredu. Vo výslednom gradiente je najnižšie pH pri anóde a najvyššie pH pri katóde. Ak sa do takéhoto gradientu pH umiestni vzorka napríklad zmesi nejakého proteínu, začne sa pohybovať podľa svojho náboja. Ak majú molekuly proteínu záporný náboj, budú sa pohybovať smerom k anóde. V dôsledku meniaceho sa pH budú molekuly postupne strácať záporné náboje a budú získavať kladné náboje. Po určitom čase sa dosiahne stav, kedy molekuly budú mať výsledný náboj nulový (pI) a ich pohyb sa zastaví. Ak sa niektorá molekula vzdiali z miesta svojho pI, získa znovu nenulový náboj (kladný alebo záporný) a elektrický potenciál ju vráti na to miesto, kde dosiahne izoelektrický bod. Týmto mechanizmom sa separované amfolyty počas elektroforézy zahustia do úzkej ostro ohraničenej zóny. V podstate sa molekuly snažia dosiahnuť miesto s nulovým potenciálom, čo je princíp izoelektrickej fokusácie IEF. Nezáleží pritom na mieste ich štartu. Bez ohľadu na to, či sa molekuly určitého amfolytu naniesli na anódový alebo katódový koniec, budú sa v gradiente pH zbiehať do miesta svojho pI, teda fokusovať.

Izoelektrická fokusácia sa používa na analytickú a preparatívnu separáciu amfoterných látok, najmä proteínov podľa ich izoelektrických bodov (pI). V optimálnych podmienkach sa IEF vyznačuje neobyčajne vysokou rozlišovacou schopnosťou. Napríklad po IEF v kombinácii s následnou SDS-elektroforézou sa dá v hrubom extrakte *E. coli* rozlíšiť viac ako 1100 rozličných proteínových zložiek. Preparatívna IEF má vysokú kapacitu (dá sa ňou deliť pomerne veľké množstvo vzorky), a to preto, že sa zóny rozdelených zložiek pri nej zaostrujú.

5. **Izotachoforéza** je ďalší typ diskontinuálnej PAGE, pri ktorej sa delia ióny vo vlastnom koncentračnom gradiente. Ióny z analyzovanej zmesi sa pohybujú medzi najpomalším (koncovým) a najrýchlejším (vedúcim) iónom. Všetky musia mať náboj rovnakého znamienka a spoločný opačne nabitý ión. Zóny rozdelených iónov sa počas izotachoforézy neustále zaostrujú, čím sa dosahuje vysoká schopnosť separácie. Delenie sa uskutočňuje v elektrolytoch pôsobením jednosmerného elektrického prúdu. Používajú sa pri tom dva elektrolyty – vedúci a zakončujúci. Vedúci elektrolyt obsahuje len jeden ión, tzv. vedúci ión, ktorý musí mať to isté znamienko ako ióny vo vzorke a jeho pohyblivosť musí byť väčšia ako pohyblivosť hociktorého iónu zo vzorky. Aj zakončujúci elektrolyt musí obsahovať len jeden – zakončujúci ión s rovnakým znamienkom ako ióny vo vzorke. Vzorka obsahujúca ióny, ktoré sa majú rozdeliť, sa aplikuje medzi tieto dva elektrolyty. Polaritu elektrického poľa je potrebné upraviť tak, aby vedúci ión migroval k elektróde, ktorá je na tej istej strane vzorky ako vedúci elektrolyt. Po uplynutí určitého migračného času systém dosiahne rovnováhu a vtedy sa všetky ióny pohybujú rovnakými rýchlosťami. Na základe tejto vlastnosti vznikol názov celej techniky (z gréckeho iso – rovnaký, ten istý, tacho – rýchlosť, z toho izotachoelektroforéza alebo skrátene izotachoforéza). Každý ión má svoju oddelenú zónu. Jej okraje sa bezprostredne dotýkajú dvoch susedných zón. Zóny jednotlivých iónov sú usporiadané podľa svojich pohyblivostí.

6. **Afinitná elektroforéza** obsahuje látky, ktoré môžu reagovať len s určitými funkčnými skupinami zo separovanej zmesi molekúl, pretože vykazujú proti nim istú afinitu. Princíp je podobný ako pri afinitnej chromatografii. Ligand sa pevne naviaže na gél (napr. inhibítory a substráty pri izolácii enzýmov) alebo sa v géle len rovnomerne rozptýli. Druhý spôsob sa používa vtedy, ak má afinant malú elektroforetickú pohyblivosť (protilátky pri rozličných typoch imunoelektroforézy). Pri afinitnej elektroforéze sa látky delia nielen podľa náboja a veľkosti svojich molekúl, ale aj podľa biošpecifickej afinity. Afinitná elektroforéza sa v praxi používa len zriedkavo.

3.9 Určenie relatívnych molekulových hmotností pomocou SDS a koncentračnej gradientovej PAGE

Relatívne molekulové hmotnosti separovaných látok sa dajú určiť vtedy, keď sa elektroforéza vykonáva v koncentračnom gradiente polyakrylamidu (postupne sa zmenšuje veľkosť pórov v géle) alebo v prítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS). Najlepšie výsledky sa dosiahnu kombináciou obidvoch spôsobov. V týchto podmienkach je pohyblivosť separovaných zložiek vzorky lineárne úmerná logaritmu ich relatívnych molekulových hmotností. Zákonitosť však platí len vtedy, keď molekuly majú aspoň približne rovnaký tvar.

Tenké vrstvy majú niektoré výhody. V tomto prípade sa diskontinuálny gradient polyakrylamidu robí vo forme vytvorenej z dvoch diapozitívnych skiel tak, že sa vopred nechá polymerizovať roztok s najvyššou koncentráciou akrylamidu a na ňom sa postupne polymerizujú roztoky vždy s nižšou a nižšou koncentráciou akrylamidu. Na prípravu takéhoto gélu sa používajú roztoky, ktoré obsahujú 2 až 30 % akrylamidu. Okrem diskontinuálneho gradientu sa dá pripraviť aj lineárny gradient polyakrylamidu. Používajú sa pri tom dva roztoky. Jeden z nich má najnižšiu a druhý najvyššiu vyžadovanú koncentráciu akrylamidu. Z nich sa pomocou miešača gradientov pripraví gradient, ktorý sa dá do formy z dvoch skiel, kde sa nechá polymerizovať. Princípom zmiešavača sú spojené nádoby, v ktorej v každej z nich je iná koncentrácia akrylamidovej reakčnej zmesi [Sambrook a Russell 2001].

Látky, ktorých relatívne molekulové hmotnosti sa majú určiť, treba rozpustiť v tlmivom roztoku s rovnakým pH a s rovnakou alebo nižšou iónovou silou ako má tlmivý roztok, ktorý sa použije vo funkcii elektrolytu. Vyššia koncentrácia solí by mohla negatívne ovplyvniť separáciu zložiek, čo sa môže prejaviť vznikom nepravidelných a difúznych škvŕn.

Ak sa k proteínom pridá SDS a redukujúce látky (2-merkaptoetanol, ditiotreitol) a potom sa tepelne denaturujú, ich trojrozmerná konformácia sa zmení, rozrušia sa S-S väzby a molekuly zaujmú približne rovnaký paličkovitý tvar. Molekuly SDS sa viažu na polypeptidy v konštantnom hmotnostnom pomere, vplyvom čoho im udeľujú skoro rovnaký záporný náboj, a tým sa eliminujú ich pôvodné nábojové rozdiely medzi molekulami. Elektroforetická

pohyblivosť takto upravených molekúl proteínov a polypetidov je potom len funkciou ich relatívnych molekulových hmotností.

SDS PAGE pre svoju jednoduchosť patrí dnes k najužívanejším metódam na určenie relatívnych molekulových hmotností proteínov a peptidov. Podstatou metódy je porovnávanie pohyblivosti skúmaného proteínu s pohyblivosťou niekoľkých štandardných proteínov so známymi relatívnymi molekulovými hmotnosťami, napr. protein ladder.

Odporúča sa, aby sa pri určovaní relatívnych molekulových hmotností (M_r) používali gély s týmito koncentráciami polyakrylamidu:

Koncentrácia polyakrylamidu	**15 %**	**10 %**	**5 %**	**3 %**
M_r proteínov (analytu)	$10^3 – 10^4$	$10^4 - 10^5$	$2 . 10^4 - 3 . 10^5$	$3 . 10^4$ až $4 . 10^6$

Pri týchto pomeroch je závislosť medzi pohyblivosťou zložiek a logaritmom ich relatívnych molekulových hmotností lineárna.

Polymerizačné roztoky sa pripravia zmiešaním vhodného roztoku akrylamidu s 0,05 objemom 1 % persíranu amónneho (napr. k 10 mL akrylamidu sa pridá 0,5 mL persíranu). Roztok akrylamidu obsahuje aj Bis (2,5 až 4 hmotnostných % z prítomného akrylamidu), 0,05 až 0,1 TEMED, 0,1 % SDS a 0,1 $mol.L^{-1}$ tlmivý roztok s pH 7-8. Z uvedených látok je výhodné pripraviť si zásobné roztoky: A – akrylamid + Bis (40 %, 19:1 alebo 37,5:1), B – 5x koncentrovaný tlmivý roztok s určitou hodnotou pH, C – TEMED, D – 10 % roztok SDS. Tieto roztoky sa tesne pred použitím zmiešajú vo vhodných pomeroch. Ak po pridaní SDS vznikne zrazenina, rozpustí sa miernym zahriatím na vodnom kúpeli. K zmesi roztokov A až D sa za stáleho miešania pridáva po malých dávkach potrebné množstvo roztoku persíranu amónneho a výsledný roztok sa vyleje do príslušných foriem, kde sa nechá polymerizovať.

Ak sa má určiť M_r úplne neznámeho proteínu, je výhodné použiť koncentračný gradient 2 až 15 % polyakrylamidu. Príprave vzorky na elektroforézu v prítomnosti SDS treba venovať osobitnú pozornosť. Ak je vzorka v roztoku, mal by mať roztok nižšiu iónovú silu ako tlmivý roztok, ktorý sa používa ako elektrolyt. V tomto prípade sa ku vzorke pridá také množstvo 10 % roztoku SDS, aby jeho výsledná koncentrácia bola 2 %. Ak je vzorka v lyofilizovanom stave, rozpustí sa v 0,01 $mol.L^{-1}$ fyziologickom roztoku s pH 7,2, ktorý obsahuje 2 % SDS.

Vzorky sa aplikujú v 20 % sacharóze alebo v 4 až 8 $mol.L^{-1}$ deionizovanej močovine a ak sa má zabrániť asociácii peptidových reťazcov, obsahujú aj 2-merkaptoetanol, ditiotreitol alebo jódacetamid. Možných je niekoľko postupov, napríklad:

1. Vzorka proteínu sa rozpustí v roztoku (0,5 až 1,0 mg na 1 mL), ktorý obsahuje 1 % 2-merkaptoetanol, 4 mol.L^{-1} močovinu, 1 % SDS a inkubuje sa 30 až 60 min pri teplote 45 °C.

2. Na rozpustenie vzorky sa použije ten istý postup ako v bode 1, len 2-merkaptoetanol sa nahradí 0,2 mol.dm^{-3} jódacetamidom.

3. Vzorky (1 až 4 mg v 2 mL) sa dialyzujú 16 h pri teplote 37 °C oproti 10 mmol.L^{-1} fosfátovému tlmivému roztoku s príslušnou hodnotou pH, ktorý obsahuje 0,1 % SDS a 0,2 % 2-merkaptoetanol. Pred elektroforézou sa vzorky zriedia 10 mmol.dm^{-3} fosfátovým tlmivým roztokom, ktorý obsahuje 2,5 % 2-merkaptoetanol a zahrejú sa 1 min na teplotu 100 °C.

Z takto upravenej vzorky sa do gélu aplikuje 10 až 50 µL (5 až 20 µg proteínu). Indikačné farbivo (brómfenolová modrá) sa zmieša priamo so vzorkou (pridá sa k nej 5 µL 0,05 % roztoku farbiva).

Elektroforéza sa vykonáva v tlmivom roztoku, ktorý obsahuje 0,1 % SDS, pri konštantnom prúde 5 až 100 mA. Pri vertikálnej elektroforéze sa anóda nachádza v dolnej časti aparatúry. Čas priebehu elektroforézy je v 5 % polyakrylamidovom géle asi 3 h a asi 5 h v 10 % géle. Elektroforéza sa zvyčajne skončí vtedy, keď indikátorové farbivo prejde približne ¾ gélu.

Po skončení elektroforézy sa gély vyberú z elektroforetickej aparatúry, odmeria sa ich dĺžka a dráha, ktorú prešlo indikačné farbivo (od horného okraja gélu po stred farebnej škvrny).

Nakoniec sa v nich pomocou farebnej reakcie s amidovou čiernou 10 B alebo Coomassie Brilliant Blue R 250 ofarbia proteíny.

Farebné indikátory, ktoré sa používajú pri detekcií látok v agarózových a polyakrylamidových géloch pri elektroforéze nukleových kyselín a proteínov.

Indikátor	Absorbčné maximum [nm]	Použitie
Amidová čierna 10 B	620	proteíny
Coomassie Brilliant Blue R 250	590	proteíny
Fast Green FCP	610	proteíny
Brómfenolová modrá	595	proteíny
Alciánová modrá	630	glykoproteíny
Zásaditý fuksín	550	Proteíny DNA a RNA
Metylénová zelená	635	DNA
Xylene Cyanole FF modrá	645	DNA, proteíny
Brómkrezolová zelená	450	proteíny
Metylénová zelená	665	RNA,RNáza
Toluidínová modrá O	620	RNA, RNáza mukopolysacharidy
Pyronín Y	510	RNA
Ethidium Bromide	480	DNA-fluorometricky

Detekcia proteínov s amidovou čiernou 10 B: Gél sa vopred 4 h fixuje v roztoku pripravenom z rovnakých dielov **metanolu** a 20 % kyseliny octovej. Potom sa 2-12 h farbí v zmesi, ktorá sa pripraví zmiešaním rovnakého množstva 1 % roztoku farbiva v 7 % kyseline octovej a metanolu, ktorý obsahuje 7 % kyselinu octovú.

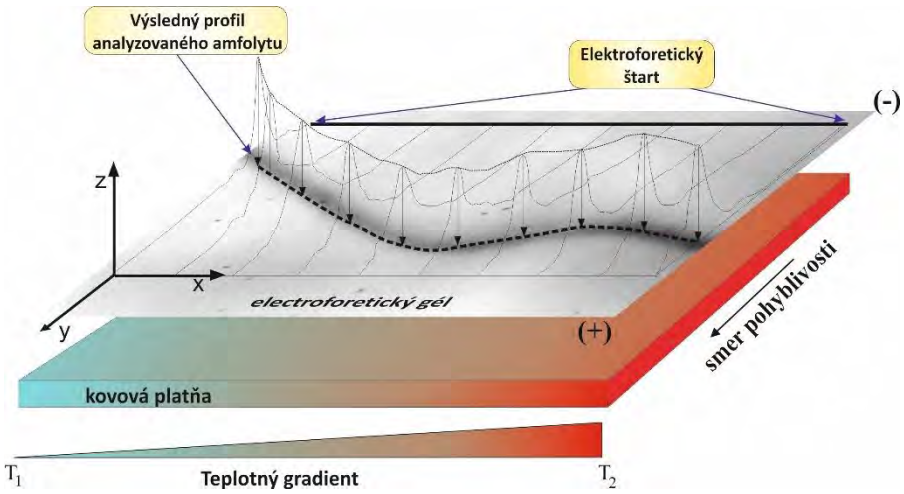
Detekcia pomocou Coomassie Brilliant Blue R 250: Gél sa na 16 až 24 h ponorí do 20 % kyseliny sulfosalicylovej a potom sa 2 až 4 h farbí v 0,25 % vodnom roztoku farbiva. Pozadie gélu sa odfarbuje 7 % kyselinou octovou niekoľko hodín. Na farbenie sa môže použiť aj 0,5 % roztok farbiva v zmesi pripravenej zo 45 mL 95 % etanolu, 45 mL destilovanej vody a 10 mL kyseliny octovej. V tomto roztoku sa gél farbí len niekoľko minút a odfarbuje sa znova v 7 % kyseline octovej. Farbenie a odfarbovanie koncentrovanejších (hustejších) gélov trvá dlhšie ako farbenie menej koncentrovaných gélov.

Pri analýze nukleových kyselín sa na ich vizualizáciu používajú buď fluorescenčné farbivá ako sú EtBr, SYBR Green I a II, GelRed a GelGreen, tiazolová oranž, tioflavín T alebo farbenie pomocou StainsAll alebo strieborné farbenie. Posledné dve z nich sa môžu použiť aj na vizualizáciu proteínov prípadne komplexov nukleových kyselín s proteínmi.

3.10 Teplotná gradientová gélová elektroforéza

Vhodnou metódou pri štúdiu konformačných prechodov nukleových kyselín a proteínov a ich stability v závislosti od gradientu denaturačného činidla sú gradientové elektroforézy. Rozlišujú sa gradientové elektroforézy s gradientom denaturačného činidla (**DGGE**) a teplotným gradientom (**TGGE**). Denaturačné podmienky môžu byť dané koncentráciou chemického detergentu (močovina, SDS). Po kvantitatívnej stránke je denaturácia štruktúry tepelným pôsobením alebo denaturačnými činidlami podobná, avšak presné vzťahy neboli stanovené pre denaturačné činidlá. Gélové elektroforetické metódy s koncentračným gradientom denaturačného činidla kolmo na smer elektrického poľa boli použité už v 80-tych rokoch minulého storočia. Častou požiadavkou je, či už ide o koncentračný alebo teplotný gradient, aby bol lineárny. Pomocou gradientových elektroforéz je možné sledovať i malé konformačné zmeny. Táto metóda sa prvýkrát použila pri analýze konformačných prechodov a pri sekvenčných variáciách nukleových kyselín v roku 1987 [Rosenbaum a Riesner 1987]. TGGE využíva vysoko reprodukovateľný lineárny teplotný gradient, ktorý sa vytvára kolmo

alebo paralelne v smere elektrickej intenzity. Biopolyméry sú separované v TGGE podľa veľkosti, tvaru a termodynamickej stability ich konformačných prechodov, ak je teplotný gradient kolmý na smer intenzity elektrického poľa. Teplotný gradient je vytvorený prostredníctvom kovovej platne spojenej s elektroforetickou aparatúrou zostavenou podľa návrhu Riesnera [Rosenbaum a Riesner 1987, Riesner a kol. 1989], ktorej zahrievanie a ochladzovanie je umožnené cirkuláciou vody cez termostat (obr.9). Gradientové elektroforézy sa v súčasnosti vo väčšine laboratórií využívajú hlavne pri separácii lineárnych fragmentov DNA s biologicky významným úsekom. V kombinácii s ďalšou molekulovo-biologickou amplifikačnou metódou, PCR, je možné používať metodiku TGGE pri skríningu nádorových buniek pri pacientoch s určitými predispozíciami vzniku nádorového ochorenia. Príkladom je identifikácia buniek s bodovými mutáciami na géne kódujúcom tumor supresujúci faktor p53 [Yamura a kol. 1994]. V poslednom čase sa technika TGGE využíva i na detekciu jednovláknového konformačného polymorfizmu určitého úseku nukleovej kyseliny, SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) [Chen a kol. 1995], či na skríning polymorfizmu v multigénových triedach vírusov hepatitídy typu C [Lu a kol. 1995]. TGGE bola využitá i pri kvantifikácii genómovej diverzity HIV-1 provirálnej DNA [Wieland 1996].



Obr.9. Schematické znázornenie princípu TGGE. Základná kovová platňa TGGE aparatúry slúži na generovaný a udržiavaný lineárny teplotný gradient, ktorý sa prenáša priamo na elektroforetický gél. Amfolyt sa pohybuje od elektroforetického štartu v teplotnom gradiente, ktorý je orientovaný kolmo na smer pohyblivosti separovanej vzorky.

3.10.1 Štúdium konformačnej stability makromolekúl teplotnou gradientovou gélovou elektroforézou

Teplotná gradientová gélová elektroforéza (TGGE) si popri bežne používaných elektroforetických technikách upevňuje svoje postavenie a to hlavne vďaka svojej schopnosti molekuly separovať a súčasne poskytnúť informácie o ich termodynamickej stabilite. Z elektroforetických záznamov TGGE je možné priamo analyzovať denaturačný profil makromolekúl ako sú nukleové kyseliny a proteíny, Obr. 10. Pri aplikácii štandardných postupov dokonca okrem teplotného profilu poskytuje aj informácie umožňujúce stanoviť ďalšie termodynamické parametre ako sú: teplota prechodu, zmena entalpie, entropie a Gibbsovej energie. TGGE sa javí popri spektrálnych a kalorimetrických metódach ako ďalší účinný nástroj štúdia štruktúrnej stability biomolekúl.

3.10.1 Biofyzikálny princíp teplotnej a denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy

Podmienky počas elektroforetického delenia sú v géle funkciou času a miesta od elektroforetického štartu. Cielená tvorba reprodukovateľných gradientov v paralelnom resp. kolmom smere na elektrické pole sú vhodnou metódou pri štúdiu konformačných prechodov proteínov a ich stability. Rozlišujú sa gradientové elektroforézy s gradientom denaturačného činidla (**DGGE**) a teplotným gradientom (**TGGE**). Denaturačné podmienky môžu byť dané koncentráciou chemického detergentu (močovina, SDS). Po kvantitatívnej stránke je denaturácia štruktúry tepelným pôsobením alebo denaturačnými činidlami podobná, avšak presné korelačné vzťahy medzi nimi nie sú stanovené. Creighton a Lerman zaviedli gélové elektroforetické metódy s koncentračným gradientom denaturačného činidla kolmo na smer elektrického poľa [Creighton 1997, Lerman a kol. 1984]. Častou požiadavkou je, aby gradient bol lineárny, či už ide koncentračný alebo teplotný. Pomocou gradientových elektroforéz je možné sledovať i malé konformačné zmeny, pretože pri optimálnych podmienkach sú na nich vysoko senzitívne. V ďalšej časti bude venovaná pozornosť TGGE. Táto metóda sa prvýkrát použila pri analýze konformačných prechodov a pri sekvenčných variáciách nukleových kyselín

v roku 1987 [Rosenbaum a Riesner 1987]. Biopolyméry sú separované v TGGE podľa veľkosti, tvaru a ich termodynamickej stability ich konformačných prechodov, ak je teplotný gradient kolmý na smer intenzity elektrického poľa. Teplotný gradient je vytvorený prostredníctvom kovovej platne spojenej s elektroforetickou aparatúrou zostavenou, ktorej zahrievanie a ochladzovanie je umožnené cirkuláciou vody cez termostat alebo pomocou Peltierových článkov, Obr.10.

Konformačný stav jednoduchých, ale aj zložitejších makromolekúl je determinovaný vonkajšími podmienkami. V určitom rozsahu podmienok sa molekuly nachádzajú v striktne definovaných stavoch. V podmienkach, v ktorých si makromolekulárny systém zachováva svoju biologickú funkciu pri danej konformácii hovoríme, že systém je v natívnom, prípadne v zbalenom stave. Ak systém v dôsledku zmien vonkajších podmienok (porúch) stráca svoje funkčné vlastnosti, hovoríme o tzv. denaturovanom (D) (rozbalenom, unfolded, U) stave. Prechod z natívneho do denaturovaného stavu je možné popísať nasledujúcou schémou:

$$\underset{1-\alpha}{N} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} \underset{\alpha}{D}$$

α je frakcia molekúl v denaturovanom stave, k_1, a k_2 sú rýchlostné konštanty charakterizujúce konformačný prechod. Medzi úplne denaturovaným a natívnym stavom môžu existovať určité medzistavy, tzv. intermediáty. Konformačný prechod makromolekúl je často sprevádzaný agregáciou monomérnych podjednotiek do celkov s vysokou molekulovou hmotnosťou.

Pre dvojstavový prechod môže byť rovnovážna konštanta medzi natívnym (zbaleným) a denaturovaným (rozbaleným) stavom určená priamo z priemernej frakcie α pre rozbalený proteín v prechodovej oblasti:

$$K_{rov} = [N]/[D] = (1-\alpha)/\alpha$$

Pričom α leží v intervale od 0 a 1. Mieru konformačnej stability makromolekuly je možné charakterizovať pomocou zmeny Gibssovej energie, ΔG, pri denaturačnom procese. Potom pre Gibbsovu voľnú energiu platí:

$$\Delta G_{ND} = G_N - G_D = -RT\ln K_{rov}$$

Pre hodnotu ΔG_{ND} v prítomnosti denaturačného činidla s určitou koncentráciou platí:

$$\Delta G_{ND} = \Delta G_{(H2O),ND} + m[denaturant]$$

Parameter m odráža závislosť voľnej energie na koncentrácii denaturačného činidla, typické hodnoty pre proteín denaturovaný močovinou a guanidíniom chloridu sú 4.1 a 12.5

kJ/mol. Aby bolo možné určiť $\Delta G_{(H2O),ND}$ bez denaturačného činidla hodnoty ΔG_{ND} sú extrapolované lineárne. Zvyčajne sú tieto hodnoty v intervale od –21 do –42 kJ/mol. Typickými denaturačnými činidlami, ktoré spôsobujú reverzibilný proces rozbaľovania sú ako pre proteíny tak aj nukleové kyseliny močovina, guanidínium chlorid, formaldehyd, chaotropné činidla a iné. Nevratné zmeny vyvolávajú detergenty, ako sú: napríklad Triton X100, SDS.

Otázkou je ako určiť z fyzikálneho merania frakciu denaturovanej časti molekúl. Podľa Paceho pre hodnotu α platí:

$$\alpha = (\mu_N - \mu_{obs}) / (\mu_N - \mu_D),$$

kde μ_{obs} je sledovaný meniaci sa parameter, μ_D a μ_N sú hodnoty odčítané z denaturačných kriviek, ktoré charakterizujú denaturovanú (rozbalenú) a natívnu (zbalenú) konformáciu molekuly, Obr.10. [Pace 1989].

Pre pohyblivosť molekuly, $\mu(T)$, platia nasledujúce vzťahy:

$\mu(T)=\mu(T_0) + c.\Delta T$, T_o je referenčná teplota, zvyčajne 20 ^oC,

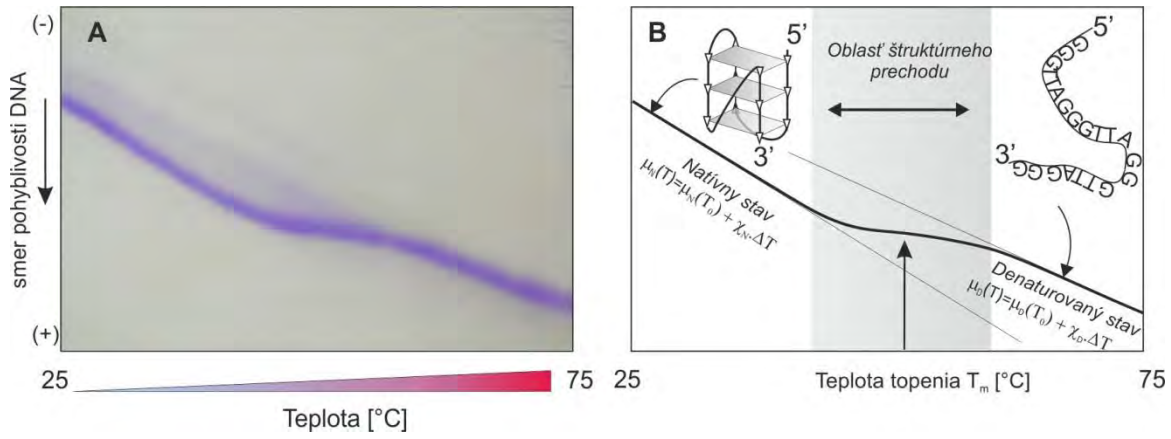
$\mu(T)-\mu(T_0)/\Delta T=\chi$, v prípade, že nedochádza k zmene konformácie je χ konštanta. Inak platí v oblasti konformačných prechodov,

$$\lim_{\Delta T \to 0} \mu(T)-\mu(T + \Delta T)/\Delta T= d\mu/dT=\chi(T).$$

Význam veličín uvedených v rovnici pre elektroforetickú pohyblivosť je:

$$\mu_N(T) = \int d\mu= \mu(T_N) +\chi_N.(T-T_N)$$

T je teplota pred rozbalením z intervalu (T,T_N) a $T < T_m$, obdobne pre teplotu po rozbalení $T>T_m$ platí, $\mu_D(T) = \int d\mu= \mu(T_D) + \chi_D.(T-T_D)$



Obr.10. A. Originálny elektroforegram telomérnej sekvencie $d(G_3T_2A)G_3$. Význam jednotlivých veličín pri stanovení termodynamických parametrov ilustruje schéma B. [Víglaský 2013].

Pre zmenu Gibssovej energie z natívnej do denaturovanej konformácie platí nasledovný vzťah:

$$\Delta G = -RT \ln [(\mu_N - \mu_{obs}) / (\mu_{obs} - \mu_D)] ,$$

kde R je plynová konštanta a T je teplota. Parameter μ_{obs} sa vypočíta pomocou vzťahu vyjadreného z predchádzajúcej rovnice:

$$\mu_{obs} = [\mu_N + \mu_D . e^{-\Delta G/RT}] / [1 + e^{-\Delta G/RT}]$$

Výsledky ukazujú, že hodnota ΔG je lineárne závislá od koncentrácii denaturačného činidla. Pri vyhodnocovaní teplotných denaturačných kriviek sa postupuje podobne ako pri pôsobení denaturačného činidla, avšak ΔG je funkciou teploty. Závislosť ΔG od teploty vyjadruje upravená Gibbs-Helmholtzová rovnica :

$$\Delta G = \Delta H_m . T . (1/T - 1/T_m) - \Delta cp (T_m - T + T . \ln(T/T_m))$$

kde T_m je teplota topenia, ΔH_m je zmena entalpie pri teplote T_m a Δcp je zmena tepelnej kapacity denaturovanej a natívnej konformácie makromolekuly. Zmena voľnej energie, ktorá sa uvoľní pri denaturácii proteínov, sa pozoruje pri pôsobení denaturačných činidiel (močovina) alebo pri pôsobení teploty. Tieto konformačné prechody prebiehajú v úzkom koncentračnom resp. teplotnom rozsahu, čo poukazuje na kooperativitu rozbaľovania makromolekuly. Akékoľvek čiastočné rozvinutie štruktúry destabilizuje zvyšok štruktúry, ktorá sa zrúti do tzv. náhodného klbka.

Poznámka: Ďalej je možné uvažovať, že pohyblivosť je funkciou aj objemu molekuly,

$\mu = \mu(T,V)$, potom platia vzťahy: $d\mu(T,V) = (\partial\mu/\partial T)_V . dT + (\partial\mu/\partial V)_T . dV$

$$d\mu(T,V)/dT = (\partial\mu/\partial T)_v + (\partial\mu/\partial V)_T . (dV/dT)$$

Princípy analýzy aplikované na krivku TGGE platia všeobecne a dajú sa uplatniť na teplotnú krivku získanú ľubovoľnou biofyzikálnou metódou, kde sa získava teplotná závislosť iného fyzikálneho parametra napríklad spektrofotometriou, fluorescenciou alebo kalorimetriou. V takýchto prípadoch sa namiesto parametra pohyblivosti aplikuje teplotná závislosť na intenzitu absorbancie, kruhového dichroizmu alebo merného tepla.

Pomocou TGGE je možné študovať teplom-indukované konformačné prechody a súčasne sledovať napríklad aj tvorbu ich agregátov. Rôzny stupeň agregácie molekúl je možné pozorovať vďaka deliacej schopnosti elektroforéz. Rozbalený proteín sa pohybuje pri elektroforéze pomalšie ako kompaktne zbalená forma s menším hydrodynamickým objemom. Ak pre separačný čas t a rýchlostné konštanty k_1 a k_2 pri TGGE platí že, $t>>1/k_1 + 1/k_2$, potom v okolí teploty prechodu medzi natívnym a denaturovaným stavom je pozorovateľný kontinuálny spojitý "nerozmazaný" pás a celkový tvar pohyblivosti vzorky od teploty má typický sigmoidálny tvar [Creighton 1997, Víglaský a kol. 2000[b], Víglaský 2013]. Situácia je odlišná v prípade keď platí, $t\sim 1/k_1 + 1/k_2$ alebo $t<1/k_1 + 1/k_2$. V tomto prípade je tvar elektroforetického záznamu v okolí teploty prechodu T_m rozmazaný, v dôsledku pomalej kinetiky prechodu molekuly z jedného do druhého stavu počas separácie.

3.10.3 Obrazová analýza elektroforetických záznamov

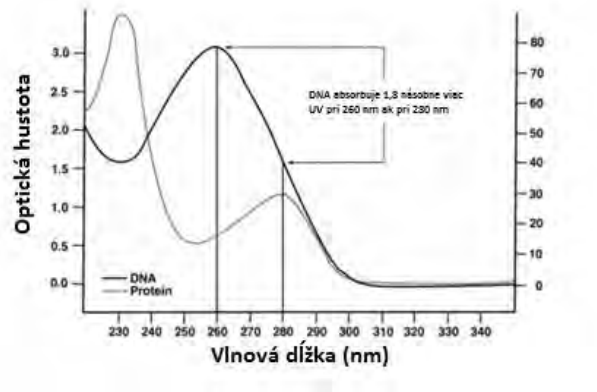
Informácie získané z rôznych experimentov je potrebné ďalej spracovávať a pri vyhodnocovaní aplikovať rôzne analytické metódy. Častou požiadavkou je namerané údaje previesť do digitálnej formy, avšak pri digitalizácii údajov z rôznych kriviek sa nesmie "vytratiť" informácia o podstate meraného deja. Väčšina špičkových laboratórnych prístrojov má implementovanú túto funkciu. Údaje v digitálnej forme je možno ďalej spracovávať rôznymi grafickými alebo matematickými programami, napríklad: previesť deriváciu, či výpočet plochy pod krivkou, alebo z množstva závislostí urobiť štatistiku nameraných procesov. V poslednom čase s rozvojom výpočtovej techniky dochádza k rozmachu digitalizácie a spracovania dvojrozmerného, prípadne i trojrozmerného obrazu. V súčasnosti je dostupných množstvo komerčných programov, ktoré pracujú s obrazom v digitálnej forme. Výhodou týchto programov je, že dovoľujú vkladať do týchto hotových programov vlastné podprogramy, tzv. plug-in moduly s určitou úzkou špecifickou funkciou šitou na mieru experimentátora. Elektroforetický záznam predstavuje dvojrozmerný obraz, ktorý je možné rozdeliť na množstvo bodov, ktoré sa líšia súradnicami a hodnotou ich intenzity, tzv. bitová mapa. Takáto digitalizácia sa dá previesť priamym skenovaním elektroforetického gélu alebo jeho fotografovaním digitálnym zariadením. V súčasnosti existuje množstvo komerčne dostupných zariadení určených pre tieto účely. Oblasti, kde je hodnota intenzity rôzna od pozadia, sa nachádzajú body odpovedajúce molekulám s pohyblivosťou, ktorá odpovedá určitej

molekulovej hmotnosti a náboju. Pokiaľ ide o kontinuálne prepojené zóny, potom hovoríme o elektroforetických pásoch. Jednotlivé pásy pri TGGE potom charakterizujú konformačný prechod. Body s najvyššou resp. najnižšou intenzitou (v závislosti od použitia farbičky pri vizualizácii gélu) reprezentujú tzv. denaturačnú krivku. Pri dvojrozmernom obraze, pri elektroforegramoch TGGE je situácia trochu komplikovanejšia, pretože sa jednotlivé pásy "izo-mobilných" molekúl môžu pretínať a vytvárať tak pomerne zložitú spleť čiar. Každú krivku odpovedajúcu elektroforetickému pásu je možné ďalej vyhodnocovať vybraným grafickým programom a aplikovať nižšie popísanú termickú analýzu pomocou fitujúcich algoritmov.

4 Spektrálne metódy

4.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA

Čistota a koncentrácia DNA vzoriek môžu byť stanovené spektrofotometricky meraním absorbancie. Množstvo absorbovaného žiarenia látkou závisí aj od vlnovej dĺžky. Nukleové kyseliny vykazujú maximum pri 260 nm, zatiaľ čo pri 280 nm absorbujú zhruba len polovicu UV žiarenia (0,55 násobok), Obr. 11. Hodnota 260 nm je viac-menej považovaná za maximum absorbancie väčšiny nukleových kyselín, reálne sa však maximum absorbancie môže líšiť aj o ± 8 nm, závisí to hlavne od pomerného zastúpenia jednotlivých nukleotidov, pretože maximá absorpcie samotných aromatických purínových a pyrimidínových báz sa mierne líšia.



Obr. 11. Typické elektrónové absorpčné spektrálne profily DNA molekúl a proteínov v UV oblasti, kde vykazujú charakteristické maximá.

Spektrofotometricky je možné určovať koncentráciu DNA na základe Lambert-Beerovho zákona do približne 100 µg/mL, nakoľko je absorpcia DNA lineárne závislá od koncentrácie len do hodnoty $A_{260} = 2$. Koncentráciu dsDNA môžeme jednoducho odhadnúť na základe nasledujúceho faktu.

Pre dvojvláknovú DNA platí, že ak je absorpcia vzorky pri 260 nm, $A_{260} = 1$, potom je v danom roztoku 50 µg DNA/na mL. Priemerná molekulová hmotnosť DNA bázového páru je 660 Daltonov a priemerná molekulová hmotnosť oligonukleotidu je 330 Daltonov. 1µg DNA odpovedá 1515 $pmol.L^{-1}$ DNA. Tento odhad platí pre kyvety s hrúbkou 1 cm. Uvedená závislosť priamo vyplýva z priemerného extinkčného koeficientu DNA o dĺžke viac ako 200 bp. V prípade užších alebo širších kyviet je potrebné túto hodnotu vydeliť alebo vynásobiť

príslušným koeficientom. Meraním absorpcie pri 260 nm môže byť odhadnutá aj koncentrácia ssDNA, RNA a oligonukleotidov.

Nukleová kyselina	Koncentrácia (µg/mL) pri A_{260}=1
dsDNA	50
ssDNA	40
RNA	40
oligonukleotidy	20

Rovnako ako DNA, tak aj proteíny absorbujú UV žiarenie a ich koncentrácia môže byť určená za pomoci spektrofotometrie. Proteíny majú dve absorpčné maximá. Maximum pri 230 nm je dané absorpciou peptidových väzieb a maximum pri 280 nm vzniká v dôsledku absorbcie s aromatickými kruhmi aminokyselín (napr. tryptofán, tyrozín a fenylalanín). Podobne ako pri DNA, aj proteíny sa líšia zložením aminokyselín, takže poloha ich absorpčného maxima sa môže mierne líšiť. Pri odhade koncentrácie proteínu sa môže použiť podobná analógia ako v prípade nukleových kyselín. Hodnota absorpcie vzorky rovná jednej pri 280 nm v 1 cm kyvete, ak je v koncentrácia proteínu približne 1 mg/mL. Tento odhad je však oveľa nepresnejší a v praxi sa používa len zriedkavo.

Jedným z kľúčových krokov pri izolácii nukleových kyselín je ich separácia od proteínov. Prímes proteínov vo vzorke DNA by mohla viesť k problémom pri jej ďalšom využití (napr. pri štiepení restrikčnými enzýmami), a preto je stanovenie čistoty DNA veľmi dôležité. Na určenie čistoty DNA sa najčastejšie používa stanovenie pomeru OD_{260}/OD_{280} (OD-optická hustota). Ako už bolo spomínané vyššie, DNA absorbuje približne dvojnásobné množstvo UV žiarenia pri 260 ako pri 280 nm. Vzorku DNA môžeme považovať za čistú, pokiaľ je tento pomer v intervale 1,8-2,0. Obyčajne je táto hodnota pri RNA molekulách mierne vyššia a dosahuje hodnoty v intervale 1,9-2,1. V prípade vzoriek, ktoré boli znečistené organickými rozpúšťadlami môžeme pozorovať ešte vyššie hodnoty. V prípade znečistenia vzoriek proteínmi je tento pomer nižší 1,1-1.6.

4.1.1 Úloha

1. Vyizolovanú vzorku plazmidovej DNA narieďte v príslušnom tlmivom roztoku (napr. Tris-EDTA) tak, aby počas merania poskytovala absorpčný signál v intervale 0,2- 1.5.

2. V príslušnom nastavení použitého spekrofotometra zvoľte vhodné parametre na daný účel a použite spektrum tlmivého roztoku bez prítomnosti nukleových kyselín ako referenciu.
3. Zmerajte vzorku plazmidovej DNA a odčítajte hodnoty A_{260} a A_{280}.
4. Stanovte koncentráciu a čistotu DNA. Pri výpočte berte do úvahy počiatočné zriedenie ku ktorému došlo pri príprave vzorky. Čistota vzorky sa určuje na základe pomeru A_{260}/A_{280}. Ak je tato hodnota okolo 1.8, potom je DNA v požadovanej čistote bez prítomnosti proteínov.

4.2 Interakcie nízkomolekulových ligandov s nukleovými kyselinami

Nukleové kyseliny predstavujú cieľové molekuly pre väzbu rôznych špecifických ligandov, z ktorých niektoré sú využívané aj ako liečiva. Niektoré z týchto liečiv sa už v súčasnosti využívajú v klinickej praxi a potenciálne liečivá sú testované v klinických štúdiách alebo v chemických laboratóriách. Účinok týchto liečiv spočíva v tom, že po väzbe s DNA môžu meniť jej vlastnosti, modulovať génovú expresiu, prípadne úplne inhibovať syntézu proteínov a ovplyvňovať replikáciu DNA molekúl.

Existuje niekoľko inštrumentálnych techník, ktoré sú bežne využívané pri štúdiu takýchto interakcií. V nasledujúcich kapitolách sa budeme venovať detailnejšiemu opisu UV-Vis spektroskopie, kruhového dichroizmu (CD spektroskopie) a fluorescenčnej spektroskopie. Okrem úloh, ktorých cieľom je analýza interakcií nukleových kyselín s ligandmi sú do nasledujúcich kapitol zahrnuté aj úlohy slúžiace na úplné pochopenie princípov daných spektrálnych metód.

4.2.1 UV-Vis spektroskopia

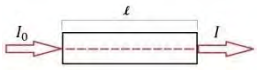
Zariadenie, ktoré sa využíva na meranie množstva svetla absorbovaného vzorkou nazývame spektrofotometer. Počas experimentu je vzorka umiestnená v kyvete, ktorá je ožiarená svetlom predstavujúcim prúd fotónov. Po interakcii fotónu s molekulou analytu je pravdepodobné, že analyt absorbuje fotón. Táto absorbcia redukuje množstvo fotónov vo svetelnom lúči, čím sa zníži intenzita svetla dopadajúceho na detektor. Množstvo

absorbovaného, resp. prepusteného žiarenia môže byť vyjadrená rôznymi parametrami ako je **transmitancia T** alebo **absorbancia A. Transmitancia T**, čiže priepustnosť je definovaná ako pomer intenzity absorbovaného žiarenia *I* a intenzity žiarenia pôvodného I_0.

$$T = I/I_0$$

Absorbancia je definovaná ako negatívny logaritmus transmitancie.

$$A = -\log T = -\log I/I_0$$



Obrázok 2. Princíp transmitancie. Žiarenie s pôvodnou intenzitou I_0 vchádza do skúmavky s optickou dráhou L. Po prechode skúmavkou absorbuje fotón a vzorkou vychádza žiarenie s intenzitou I.

Lambert-Beerov zákon:

V prípade, že v dvoch identických skúmavkách naplnených farebným roztokom, ktorý vznikol rozpustením tej istej látky, pozorujeme rozličný stupeň intenzity zafarbenia, čiže v jednej sa nachádza tmavší roztok ako v druhej, automaticky predpokladáme, že prvá skúmavka obsahuje vyššiu koncentráciu látky. Rovnako predpokladáme, že tmavší roztok bude absorbovať v určitej spektrálnej oblasti viac žiarenia ako svetlejší roztok. To znamená, že s narastajúcou koncentráciou rastie aj absorbancia. V prípade, že dve skúmavky obsahujú rovnako koncentrovaný roztok tej istej látky a jediný rozdiel je v tom, že prvá skúmavka je širšia ako druhá, optická dráha je dlhšia. Po ožiarení skúmaviek so svetlom o rovnakej intenzite prechádza svetlo v prvej skúmavke dlhšiu dráhu ako v skúmavke druhej. Z toho môžeme dedukovať, že v prvom prípade dôjde ku absorpcii žiarenia vo väčšej miere. Z toho vyplýva, že absorbancia narastá s narastajúcou dĺžkou dráhy. Tieto popísané hypotetické prípady vysvetľuje v svojej podstate **Lambert-Beerov zákon**: $A = \varepsilon . l . c$, kde A je absorbancia vzorky, ε je molárny extinkčný koeficient, l predstavuje optická dĺžka kyvety a c je koncentrácia látky. Jeho použitie je limitované do určitých koncentrácii, kde absorbancia látky je nižšia ako 2.

4.2.2 Štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi prostredníctvom UV-Vis spektroskopie

Spektrofotometria predstavuje jednu z najčastejšie používaných metód pre štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi. Vo viditeľnej oblasti spektra vytvárajú farebné ligandy

zreteľne rozlíšiteľný absorbčný pás. Jednoduchý spôsob, akým sa dá určiť či dochádza k interakcii medzi nukleovou kyselinou a ligandom je analýza posunu absorbčného maxima ligandu a zmeny jeho intenzity po pridaní DNA. Analyzuje sa teda rozdiel medzi absorbčným maximom ligandu voľného v roztoku a ligandu, ktorý v roztoku vytvára komplex s DNA. Okrem toho sa spektrofotometria dá využiť aj na stanovovanie stechiometrických a väzbových konštánt. Pri tomto type analýzy je ale potrebné vykonať reverznú titráciu, t.j. pridávať ligand do roztoku obsahujúceho DNA.

Ďalším spôsobom analýzy interakcie medzi nukleovými kyselinami a ligandmi je stanovenie zmeny teploty topenia (ΔT_m). Pri tomto type experimentov sa sleduje závislosť absorbancie pri určitej vlnovej dĺžke od teploty. Krivka topenia má sigmoidálny tvar a jej stredná hodnota odpovedá teplote topenia. Porovnaním teplôt topenia DNA v neprítomnosti a v prítomnosti ligandu je možné zistiť, či dochádza k jej merateľnej zmene v dôsledku vzájomnej interakcie. Okrem toho je z krivky topenia možné určiť, či ligand stabilizuje, zvyšuje alebo znižuje hodnotu T_m.

Počas analýzy interakcií nukleových kyselín s ligandmi sa môžeme stretnúť s nasledujúcimi zmenami v spektre:

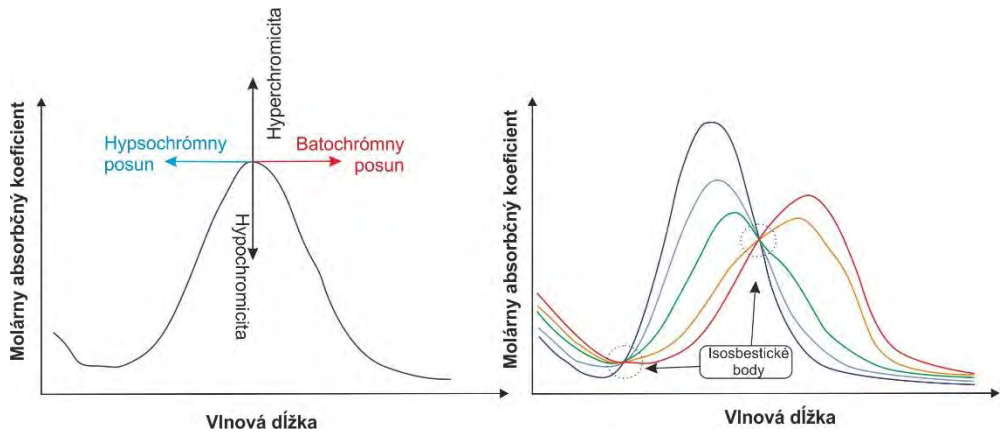
Batochrómny posun je zmena v pozícii absorbčného maxima k vyšším vlnovým dĺžkam. Nakoľko sa v spektre nachádza červená farba pri väčších vlnových dĺžkach, tak je aj tento posun niekedy označovaný ako červený.

Hypsochrómny posun je zmena v pozícii absorbčného maxima k nižším vlnovým dĺžkam. Niekedy je označovaný aj ako modrý posun.

Hyperchrómny jav je nárast absorbčného maxima v spektre. Tento jav je pozorovaný napr. počas denaturácie DNA, kedy dochádza k separácii jednotlivých vlákien dvojzávitnice.

Hypochrómny jav je pokles absorbčného maxima v spektre. Hyperchrómny a hypochrómny jav sú javy často pozorované pri experimentoch teplotného topenia.

Izosbestické body predstavujú oblasť v spektre odpovedajúce vlnovej dĺžke, pri ktorej sa všetky spektrá pretínajú. V prípade komplexov DNA-ligand je prítomnosť takýchto bodov dôkazom, že existuje rovnováha medzi dvoma formami molekúl ligandu (voľná a naviazaná forma). Izosbestické body sú sprievodným znakom interakcie medzi ligandom a nukleovou kyselinou, Obr.12.



Obr. 12. Schematické znázornenie rôznych spektrálnych posunov (vľavo) a izobestických bodov (vpravo) pozorovaných pri spektrálnej analýze nukleových kyselín a proteínov.

4.2.3. Úlohy k titračnej analýze

1. Pripravte vzorku príslušného ligandu nariedením zo zásobného roztoku vo vybranom tlmivom roztoku tak, aby počas merania poskytoval dostatočný signál.
2. V príslušnom programe na meranie nastavte vhodné parametre a zmerajte tlmivý roztok ako referenciu.
3. Vzorku postupne titrujte s vybranou nukleovou kyselinou (DNA alebo RNA) alebo iným typom nukleovej kyseliny.
4. Popíšte a odôvodnite zmeny pozorované v spektre, vypočítajte koncentráciu ligandu a DNA v kyvete.
5. Do vzorky pridajte $MgCl_2$, popíšte pozorované zmeny a stanovte koncentráciu $MgCl_2$ v kyvete. Mg2+ stabilizuje štruktúru dvojzávitnice a väzba ligandov je sťažená.
6. Pripravte vzorku DNA alebo RNA nariedením zo zásobného roztoku vo vybranom tlmivom roztoku tak, aby počas merania poskytoval dostatočný signál. Absorbancia by mala dosiahnuť hodnotu v rozsahu 0,4 – 1,5.
7. Titrujte danú vzorku s vybraným ligandom v koncentračnom rozsahu 1- 200 $\mu mol.L^{-1}$.
8. Zo zaznamenaných titrácií vyvoďte závery o interakcii DNA s ligandom.

4.2.4. Spektroskopická analýza denaturačného profilu vybraného proteínu alebo nukleovej kyseliny pomocou detergenčných činidiel

Natívna priestorová konformácia proteínov je udržiavaná pomocou slabých nekovalentných interakcií. Ak je proteín vystavený napríklad vysokým teplotám alebo chemickej zmene dochádza k ovplyvneniu týchto slabých interakcií stabilizujúcich natívnu štruktúru proteínov. Pri denaturačnom procese dochádza k zmene jeho štruktúrnych parametrov, ovplyvňujú aj termodynamické, spektrálne a hydrodynamické vlastnosti, a tým vplývajú na optickú otáčavosť, viskozitu, tepelnú kapacitu, fluorescenciu a absorpciu žiarenia. Tieto biofyzikálne parametre sa náhle menia v úzkom teplotnom rozmedzí. Čím je tento konformačný prechod užší vzhľadom k poruche vyvolávajúcej konformačný prechod makromolekuly, tým je kooperativita tohto štruktúrneho prechodu väčšia. Akékoľvek čiastočné rozvinutie štruktúry destabilizuje zvyšok štruktúry, ktorá môže mať tvar neusporiadaného klbka pri proteínoch alebo náhodný "helix-coil-helix" tvar pri nukleových kyselinách. Stredná teplota tohto procesu sa nazýva teplota prechodu T_m. Väčšina proteínov a nukleových kyselín má hodnoty T_m nižšie ako 100 °C. Výnimkou sú proteíny termofilných baktérií, ktorých teplota topenia môže byť aj vyššia ako 100 °C. Teplota topenia sekundárnej štruktúry nukleových kyselín závisí od obsahu G:C párov v molekule ale aj od konkrétneho sekundárneho motívu. Napríklad G-kvadruplexy nemusia obsahovať G:C páry ale Hoogsteenove párovanie (G:G:G:G kvartet), ktoré takýto motív stabilizujú ešte viac a teplota topenia môže dosiahnuť aj viac ako 100 °C. Terciárna štruktúra pri RNA molekulách je na zmeny teplôt ešte viac senzitívna. Pri topení sa sekundárnych motívov v nukleových dochádza k oddeľovaniu jednotlivých reťazcov a súčasne táto zmena indukuje aj zvýšenie absorbancie pri 260 nm, tzv. **hyperchrómny efekt.**

Okrem zmeny teploty existujú ďalšie možnosti, ako vyvolať denaturáciu proteínov.

1. Zmeny pH spôsobujú ionizáciu postranných aminokyselinových zvyškov peptidových reťazcov, čím sa mení rozloženie náboja proteínu.

2. Niektoré detergenty rozrušujú štruktúru proteínov hydrofóbnymi interakciami s nepolárnymi zvyškami proteínu.
3. Vysoké koncentrácie organických látok rozpustných vo vode napr. alifatické alkoholy. Organické látky s niekoľkými hydroxylovými skupinami napr. sacharóza, etylénglykol sú pomerne slabé denaturačné činidlá, pretože ich schopnosť vytvárať vodíkové mostíky nenarušuje významne štruktúru vody. Detergent dodecylsíran sodný (SDS) sa pevne viaže k proteínom a mení ich tvar do valcovitej podoby. Vysoký negatívny náboj naviazaného SDS prekrýva vlastný náboj proteínu, takže proteíny pokryté SDS majú zhodné pomery počtu nábojov na jednotku hmoty a podobný tvar. Ako už bolo uvedené vyššie, tento jav sa úspešne využíva pri SDS PAGE pri stanovení molekulovej hmotnosti a čistoty vzorky.
4. Rozmanitý je vplyv solí. Niektoré soli napr. síran amónny, stabilizujú štruktúru natívneho proteínu (zvyšujú jeho T_m). Chlorid draselný a sodný majú malý vplyv a napr. bromid lítny ju naopak destabilizujú. Avšak v prípade G-kvadruplexov je draslíkový ión stabilizuje tento motív najvýraznejšie.
5. Chaotropné činidlá zvyšujú rozpustnosť nepolárnych látok vo vode. Ich účinok ako denaturačných činidiel je dôsledkom ich schopnosti porušiť hydrofóbne interakcie.

4.2.5 Úlohy

1. Spektrálne sledovanie indukcie denaturačného procesu pomocou kontinuálneho zvyšovania a znižovania teploty.
2. Spektrálne sledovanie denaturačného procesu indukovaného detergentom a zmenou pH.
3. Spektrálna analýza hyperchromného javu nukleových kyselín.

Pomôcky a materiál:

Hemoproteín (hemoglobín, myoglobín alebo cytochróm c) rozpustíme v koncentrácii 10 mg/mL vo vybranom tlmivom roztoku fosfátové tlmivé roztoky (KH_2PO_4 s K_2HPO_4), pH: 7.6 a 4.6, 1 % roztok SDS, spektrofotometer Varian s termostatom, pH meter, laboratórne váhy.

Postup k úlohe 1:

Zo získanej absorbčnej krivky hemoproteínu, meranej v rozmedzí vlnových dĺžok 380 – 460 nm určíme vlnovú dĺžku λ_{max}, kde je maximum absorbancie vzorky, A_{max}. Titráciou vybraného denaturačného činidla pri λ_{max} budeme sledovať vplyv denaturačného činidla na jeho absolútnu hodnotu absorbancie. Ako detergenčné činidlo použijeme buď SDS, močovinu alebo Triton X-100. Do oboch kyviet spektrofotometra napipetujeme 3 mL tlmivého roztoku o pH = 4,5, 10 µL hemoproteínu a do meracej kyvety pridávame po 10 µl 1% roztoku SDS. Meranie opakujeme aj s 0,1 % roztokom SDS. Rovnaký experiment vykonáme aj s pH = 7,5 a 9,5. Do grafu nanesieme závislosť absorbancie hemoproteínu od koncentrácie pri všetkých troch hodnotách pH. Kalibráciu na zriedenie vykonáme pomocou titrovania vzorky destilovanou vodou s rovnakými objemami ako pri použití detergentu.

Postup k úlohe 2:

Do oboch kyviet spektrofotometra napipetujeme 3 mL fosfátového roztoku s rôznou hodnotou pH (4.6, 7.5 a 9.5) a 30 µL hemoproteínu zo zásobného roztoku 10 mg/mL . Denaturačnú krivku meriame pri konštantnej vlnovej dĺžke λ_{max}, kde proteín vykazuje maximum absorbancie vo viditeľnej oblasti spektra. Teplotný interval je 40 - 90 °C. Do grafu nanesieme závislosť absorbancie od teploty. Namerané hodnoty teplotnej závislosti absorbancie vyhodnotíme pomocou grafického programu (napr. Grafit, Sigma Plot) a určíme hodnoty termodynamických parametrov.

Ako fitujúce parametre použijeme v rovnici $\mu(T)=\{\mu_F+\mu_U.\ exp(\Delta G/RT)\}/\{1+ exp(\Delta G/RT)\}$

μ_F, μ_U, χ_F, χ_F, χ_U a ΔG. Pričom za ΔG budeme zadávať hodnotu určenej z modifikovanej Helmholtzovej rovnice: $\Delta G= \Delta H_m(1-T/T_m)$.

Postup k úlohe 3.:

Hyperchrómny jav DNA/RNA od teploty molekúl budeme sledovať pomocou absorbčnej spektroskopie, CD spektroskopie a teplotnej gradientovej gélovej elektroforézy.

4.3. CD spektroskopia

Princíp kruhového dichroizmu (CD) vychádza z rozdielnej absorbcie ľavo- a pravo-kruhovo polarizovaných zložiek polarizovaného žiarenia. Merateľný signál vzniká len v prípade, ak je študovaná molekula chirálna (opticky aktívna) [Kelly 2000]. Ak pôvodne opticky neaktívna

látka tvorí komplex s inou chirálnou molekulou, môže tiež vykazovať merateľný CD signál, ktorý vzniká v dôsledku javu nazývaného indukovaná chiralita. CD spektrum získame, ak je dichroizmus meraný ako závislosť vlnovej dĺžky. Hodnota molárneho dichroizmu je definovaná ako rozdiel molárnych extinkčných koeficientov ľavo- a pravo- kruhovo polarizovaných zložiek:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \ [\mathrm{M}^{-1}.\ \mathrm{cm}^{-1}].$$

Veličina používaná pri charakterizácii kruhového dichroizmu sa nazýva elipticita (θ) a je vyjadrená v stupňoch. Vzľah medzi cirkulárnym dichroizmom a molárnou elipticitou je:

$\Delta\varepsilon = 3298{,}2.\theta$ [Kelly 2000].

4.3.3. Štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi pomocou CD spektroskopie

Rovnako ako v prípade absorbčnej spektrofotometrie predstavuje aj metóda kruhového dichroizmu jednu zo základných techník využívaných pri štúdiu interakcii nukleových kyselín s ligandmi. Okrem toho je táto metóda využívaná aj pri štúdiu štruktúry a stability nukleových kyselín, či už voľných alebo vo väzbe s ligandom. CD spektropolarimetria umožňuje jednoduchý spôsob monitorovania konformačných zmien v DNA štruktúre, ktoré môžu byť zapríčinené zmenami v prostredí, akými sú napr. pH, teplota, prítomnosť rôznych činidiel a pod., alebo prostredníctvom chemických modifikácií.

Aj keď sa CD spektroskopia využíva pri stanovení konformácie proteínov a nukleových kyselín, výsledky CD spektroskopie nie sú vždy úplne jednoznačné. Z uvedeného dôvodu sa v praxi využíva k tomuto účelu kombinácia viacerých experimentálnych metód, najmä NMR spektroskopia. Pri niektorých štruktúrnych motívoch je ale akceptované, že na základe profilu CD signálov, môže byť odhadnutá priestorová štruktúra nukleových kyselín a podiel β-skladaných listov a α-závitníc v proteínoch, ktorý sa zvyčajne líši v natívnych a denaturovaných stavoch. V priebehu laboratórnych cvičení sa bude hlavná pozornosť venovaná hlavne analýze konformácií B-DNA a rôznych typov sekundárnych motívov v DNA ako sú napríklad G-kvadruplexy. Charakteristické CD signály pre určité topológie sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Typ konformácia	Maximum [nm]	Minimum [nm]
B-DNA	258 a 275	245
G-kvadruplex - paralelný	265	240
G-kvadruplex - antiparalelný	295, 245	260
G-kvadruplex - hybridný (3+1)	295, 265	235

CD spektroskopia je vo veľkej miere využívaná aj pri štúdiu interakcií medzi nukleovými kyselinami a ligandmi. Mnohé ligandy sú opticky neaktívne molekuly, ktoré nevykazujú CD signál v roztoku. Ako už bolo uvedené vyššie v niektorých prípadoch, keď dochádza k väzbe ligandu ku chirálnej molekule ako je napríklad molekula DNA, vzniká v oblasti vyšších hodnotách vlnových dĺžok tzv. **indukovaný CD signál** (**ICD**) a to práve v oblastiach vlnových dĺžok odpovedajúcich absorpcii ligandu. ICD signál je jedným zo znakov interakcie medzi nukleovou kyselinou a ligandom. Avšak ICD signál nemusí vznikať všeobecne pri väzbe každého ligandu s chirálnou molekulou.

CD spektroskopia je často používaná aj na monitorovanie teplotnej denaturácie nukleových kyselín. Počas takéhoto experimentu je zaznamenávaný kruhový dichroizmus pri určitej vlnovej dĺžke v závislosti od teploty. Zvyčajne sa monitoruje vlnová dĺžka, pri ktorej bolo pozorované maximum elipticity študovanej nukleovej kyseliny v celom meranom rozsahu vlnových dĺžok. S postupným nárastom teploty dochádza v prípade nukleových kyselín obyčajne k reverzibilnej denaturácii sekundárnej štruktúry, čo sa začne prejavovať poklesom elipticity tohto maxima. Typická teplotná krivka dvojstavového systému má sigmoidálny tvar, pričom hodnota teploty topenia, ktorá reprezentuje rovnováhu medzi natívnou a denaturovanou štruktúrou je stredná hodnota topenia T_m. Teplota topenia je teda definovaná ako teplota, pri ktorej sa polovica nukleových kyselín nachádza v zbalenej sekundárnej štruktúre a druhá polovica je rozvinutá do jednovláknovej štruktúry (denaturovanej).

Teplota topenia je závislá od štruktúrnej stability konkrétnej nukleovej kyseliny. Stabilita nukleových kyselín môže byť ovplyvnená mnohými faktormi, aj prítomnosťou ligandu, ktorý môže stabilitu zvyšovať alebo znižovať. Špecifická interakcia nukleovej kyseliny s ligandom vyvoláva väčšinou takú zmenu v jej štruktúre, ktorá sa vo väčšine prípadov prejaví zvýšením teploty topenia T_m. Teplota topenia je ovplyvnená typom a silou vzájomnej interakcie medzi ligandom a cieľovou molekulou.

4.3.1 Úlohy

Meranie CD spektier D- a L- izoméru metylbenzylamínu

1. Vzorky L a D izomérov metylbenzylamínu rozpusťte v 96 % etanole v objemovej koncentrácii 10 %.
2. Zmerajte spektrá jednotlivých vzoriek v rozsahu 220 – 300 nm vzhľadom k referencii a odôvodnite pozorované javy. UV čistý etanol je použitý ako referencia.

Analýza CD a UV-vis spektier vybraného ligandu s DNA

1. Vzorku vybraného farebného ligandu na meranie pripravte rozpustením v 25 $mmol.L^{-1}$ tlmivom roztoku Robinson-Brittona, pH 7, tak aby jeho absorbancia vo viditeľnej oblasti bola v rozsahu 0,2 – 0,9 pri použití 0,1 cm kyvety.
2. Nastavte na CD spektrofotometri vhodné parametre (vlnová dĺžka 600-220 nm) a zmerajte tlmivý roztok ako referenciu.
3. Zmerajte vzorku a interpretujte namerané spektrum.
4. Vzorku postupne titrujte s vybraným oligonukleotidom DNA. Po každom prídavku DNA zmerajte spektrum.
5. Popíšte vzniknuté spektrum a odôvodnite vzniknuté zmeny.

Meranie CD spektier G-kvadruplexovej štruktúry s ligandom

1. Pripravte vzorku na meranie. Vzorka má obsahovať G-bohatý oligonukleotid rozpustený v 25 $mmol.L^{-1}$ tlmivom roztoku Britton-Robinsona, pH 7 a 50 $mmol.L^{-1}$ KCl alebo NaCl.
2. Nastavte na CD spektrofotometri vhodné parametre (vlnová dĺžka 600-220 nm) a zmerajte tlmivý roztok obsahujúci 50 $mmol.L^{-1}$ KCl (NaCl) ako referenciu.
3. Zmerajte vzorku a identifikujte typ nameraného G-kvadruplexu.
4. Vzorku postupne titrujte ligandom. Po každom prídavku premerajte spektrum.
5. Popíšte vzniknuté spektrum a odôvodnite vzniknuté zmeny.

Meranie teplotnej stability G-kvadruplexovej štruktúry a komplexu G-kvadruplex-ligand

1. Pripravte vzorku na meranie. Vzorka má obsahovať G-bohatý oligonukleotid rozpustený v 25 mmol.L^{-1} roztoku Britton-Robinsona, pH 7, 50 mmol.dm^{-3} KCl alebo NaCl.
2. Nastavte na CD spektrofotometri vhodné parametre (vlnová dĺžka 220 - 320 nm) a zmerajte tlmivý roztok s 50 mmol.dm^{-3} KCl (NaCl) ako referenciu.
3. Zmerajte CD spektrum vzorku a odčítajte vlnovú dĺžku, pri ktorej vykazuje oligonukleotid maximum elipticity.
4. Nastavte vhodné parametre na meranie teplotnej stability a zmerajte tlmivý roztok s 50 mmol.L^{-1} KCl (NaCl) ako referenciu.
5. Zmerajte vzorku a určte teplotu topenia pre daný oligonukleotid.
6. Po meraní nechajte vzorku vychladnúť pri laboratórnej teplote.
7. Nastavte vhodné parametre (vlnová dĺžka 220 - 600 nm) a zmerajte spektrum.
8. Vzorku titrujte postupne ligandom. Po každom prídavku zmerajte spektrum. Po poslednom prídavku odčítajte vlnovú dĺžku, pri ktorej vykazuje oligonukleotid maximum elipticity.
9. Zmerajte teplotnú stabilitu podľa vyššie uvedených pokynov.
10. Určte teplotu topenia komplexu G-kvadruplex-ligand a porovnajte ju s teplotou topenia G-kvadruplexu.

4.4. Fluorescenčná spektroskopia

Luminiscencia je emisia svetla látky, ktorá vzniká v dôsledku prechodu elektrónov z excitovaných do základných stavov. Luminiscenciu vo všeobecnosti rozdeľujeme do dvoch kategórií, ktoré sa líšia povahou excitovaného stavu na fluorescenciu a fosforescenciu. V excitovanom singletovom stave je elektrón excitovaného orbitálu spárovaný (opačným spinom) s ďalším elektrónom. V dôsledku toho je návrat do základného stavu spinovo povolený a sprevádzaný emisiou fotónu. Miera fluorescenčnej emisie je rádovo 10^8 s^{-1}, takže typická životnosť fluorescencie je rádovo 10 ns (10 x10^{-9} s). Fosforescencia je emisia svetla z tripletového stavu. Elektrón v excitovanom stave má rovnakú orientáciu spinu ako elektrón v základnom stave orbitálu. V dôsledku toho je takýto prechod označovaný ako zakázaný a miera emisie je pomalá (10^3 až 10^0 s^{-1}), čiže životnosť fosforescencie je rádovo v milisekundách až sekundách [Lakowicz 2006].

Fluorescenciu typicky vykazujú aromatické molekuly a takéto molekuly sa nazývajú ako fluorofóry. Medzi typické fluorofóry patri napr. chinín, fluoresceín, pyridín, akridínová oranž a pod.

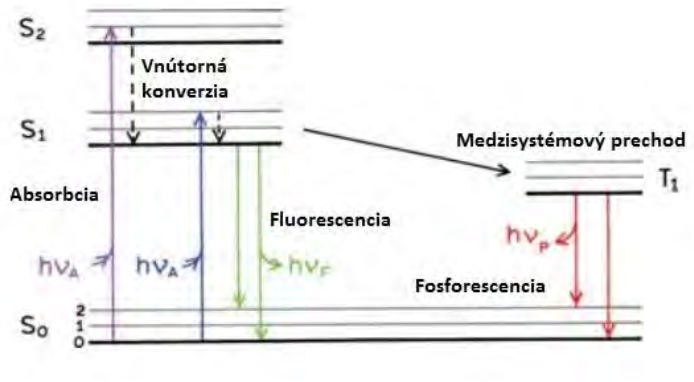
Jablonského diagram:

Všetky procesy ku ktorým dochádza medzi absorbciou a emisiou žiarenia môžu byť jednoducho vysvetlené prostredníctvom Jablonského diagramu. Typický Jablonského diagram je znázornený na Obr.13. Singletový základný, prvý a druhý elektrónový stav je označený ako S_0, S_1 a S_2. Na každej z týchto energetických hladín sa môžu fluorofóry nachádzať na vibračných hladinách, ktoré sú označené ak 0, 1, 2. Prechody medzi jednotlivými stavmi sú znázornené vertikálnymi čiarami.

Po absorbcii svetla je fluorofór obvykle excitovaný na vyššiu vibračnú hladinu elektrónového stavu S_1 alebo S_2. Následne dochádza k rýchlej relaxácii na najnižšiu vibračnú úroveň stavu S_1. Tento proces sa nazýva vnútorná konverzia a zvyčajne k nemu dochádza v čase 10^{-12} s. K návratu do základného stavu väčšinou dochádza cez vyššiu vibračnú hladinu základného stavu S_0. Zaujímavým dôsledkom emisie z vyššej vibračnej hladiny S_0 stavu je, že emisné spektrum predstavuje zrkadlový obraz absorbčného spektra $S_0 \rightarrow S_1$ prechodu. K tejto podobnosti dochádza v dôsledku toho, že rozstupy medzi jednotlivými vibračnými hladinami excitovaných stavov sú podobné ako v základnom stave.

Molekuly z S_1 stavu môžu podstúpiť konverziu na prvú tripletovú hladinu T_1. Emisia zo stavu T_1 je označovaná ako fosforescencia a býva posunutá ku väčším vlnovým dĺžkam v porovnaní s fluorescenciou. Prechod z S_1 do T_1 sa nazýva medzisystémový prechod. Prechod zo stavu T_1 do singletového základného stavu je spinovo zakázaný.

Z Jablonského diagramu vyplýva, že energia emisie je typicky nižšia ako energia absorpcie. Z toho dôvodu k fluorescencii dochádza pri nižších energiách a väčších vlnových dĺžkach. Tento jav sa nazýva **Stokesov posun.**



Obr. 13. Jablonského diagram. S_0, S_1, S_2- základný, prvý a druhý singletový stav; T_1- tripletový stav; 0,1,2- vibračné hladiny.

4.4.1 Štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi prostredníctvom fluorescenčnej spektroskopie

Zhášanie fluorescencie

Na štúdium interakcie nukleových kyselín s ligandmi prostredníctvom fluorescenčnej spektroskopie sa často využíva metóda zhášania fluorescencie. Intenzita fluorescencie môže byť znížená viacerými mechanizmami, pričom proces pri ktorom dochádza k takémuto znižovaniu intenzity nazývame ako zhášanie fluorescencie. Takzvané kompetitívne zhášanie nastáva vtedy, keď je fluorofór z excitovaného stavu deaktivovaný po kontakte s inou molekulou v roztoku, ktorá sa nazýva ako zhášač. Okrem kompetitívneho zhášania môže dôjsť ku zhášaniu fluorescencie aj inými procesmi. Fluorofóry môžu vytvárať nefluoreskujúce komplexy so zhášačmi. Tento proces sa označuje aj ako statické zhášanie, pretože k nemu dochádza v základom stave a nezávisí od kolízie molekúl. Zhášanie môže prebiehať aj rôznymi triviálnymi nemolekulovými mechanizmami, ako je napríklad zoslabením excitačného žiarenia samotným fluorofórom alebo inou absorbujúcou látkou v roztoku.

Pri kompetitívnom zhášaní je často využívaná fluorescenčná sonda etídium bromid (EtBr) pre jej silnú fluorescenciu po väzbe s DNA. Voľný EtBr v podmienkach tlmivého roztoku vykazuje redukovanú intenzitu fluorescencie v dôsledku zhášania rozpúšťadlom alebo dôsledkom fotoelektrónového transportného mechanizmu. Intenzita fluorescencie sa po väzbe s DNA rapídne zvýši v dôsledku stérickej zábrany, ktorú poskytujú nukleotidy molekulám EtBr.

4.4.2 Úlohy

Úloha 1:

1. Vzorku na meranie pripravte rozpustením EtBr v príslušnom tlmivom roztoku tak, aby počas merania poskytoval dostatočný signál.
2. V programe na meranie nastavte vhodné parametre a zmerajte spektrum.
3. Vzorku postupne titrujte s ctDNA. Po každom prídavku premerajte spektrum.
4. Po ukončení titrácie nastavte vhodné parametre na meranie teplotnej stability a zmerajte krivku teplotnej závislosti. Interpretujte pozorované zmeny.
5. Po zmeraní vzorku nechajte vychladnúť pri laboratórnej teplote.
6. Vzorku ďalej postupne titrujte ligandom (napr. DAPI). K čomu počas titrácie dochádza?

Úloha 2:

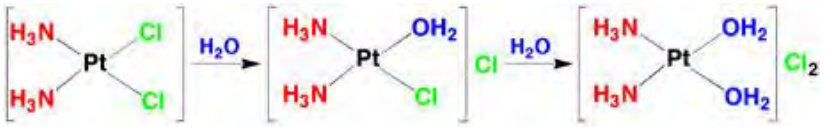
1. Vzorku na meranie pripravte rovnako ako v predchádzajúcej úlohe a to rozpustením EtBr v príslušnom tlmivom roztoku.
2. Nastavte vhodné parametre a zmerajte spektrum.
3. Vzorku postupne titrujte s $MgCl_2$ a interpretujte pozorované zmeny.

Úloha 3

1. Vzorku na meranie pripravte rozpustením vybraného ligandu v príslušnom tlmivom roztoku tak, aby počas merania poskytoval dostatočný signál.
2. V programe na meranie postupne nastavujte rôzne parametre excitačného žiarenia. Nájdite vlnovú dĺžku excitačného žiarenia, pri ktorej pozorujete najlepší signál. Zhoduje sa táto vlnová dĺžka s absorbčným maximom ligandu? Svoju odpoveď zdôvodnite.

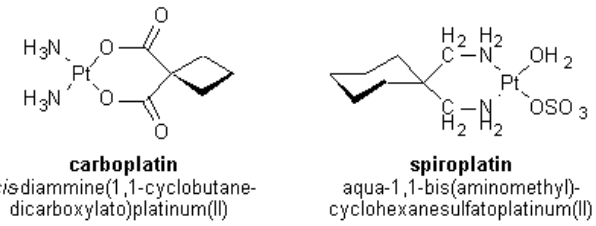
5 Vplyv *cis* a *trans* platinových derivátov na štruktúru DNA molekúl

Platinové deriváty odvodené prevažne od dichloro diamino-*cis*-platiny (*cis*-$[PtCl_2(NH_3)_2]$, *cis*platina) zohrávajú dôležitú úlohu pri klinickej liečbe niektorých nádorových ochorení. Cisplatina je klinicky používaná pri liečbe nádorov semenníka, vaječníkov a iných typov nádorových ochorení od roku 1978. Pri nádoroch semenníkov je jej úspešnosť nad 90 %. Verí sa, že cytotoxicita cisplatiny je spôsobená kovalentnou väzbou viazania sa na bázy nukleových kyselín v molekule DNA, avšak toto liečivo zostáva relatívne intaktné v krvnom riečišti, kde je vysoká koncentrácia chloridov, ktoré potláčajú aktivitu liečiva. Cisplatina po prechode bunkovou stenou vytvára aqua/chloro komplex, ktorý je schopný reagovať s DNA, obr. 14.

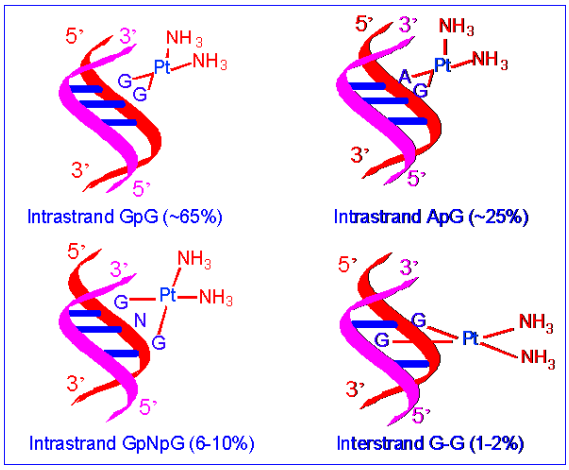


Obr. 14.: Tvorba aqua komplexu cisplatiny

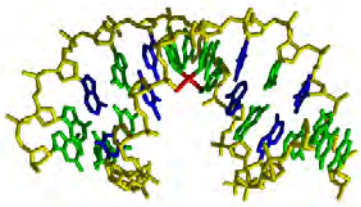
Naproti tomu dichloro diamino-*trans*–platina (*trans* platina) je biologicky neúčinná. Hľadaniu nových derivátov odvodených od t*rans* konfigurácie je v posledných rokoch venovaná veľká pozornosť, pretože sa ukazuje, že i niektoré deriváty *trans* platiny sú biologicky účinné. Platinové deriváty sa viažu s DNA kovalentne prostredníctvom guanozínových alebo v menšej miere i adenozínových zvyškov, G>A. Výsledkom sú monofunkčné a bifunkčné adukty, a to intra- a interstrand-crosslink (IAC, IEC), obr.15,16. Väzba platinových derivátov indukuje odvíjanie báz a ohyb DNA molekuly práve v mieste kovalentnej väzby. Súhrnne označujeme takúto lokálnu zmenu na DNA molekule ako distorzia DNA, obr. 17.



Obr. 15. Štruktúry karboplatiny a spiroplatiny.



Obr. 16. Typy a percentuálny podiel možností viazania sa cisplatiny s DNA.



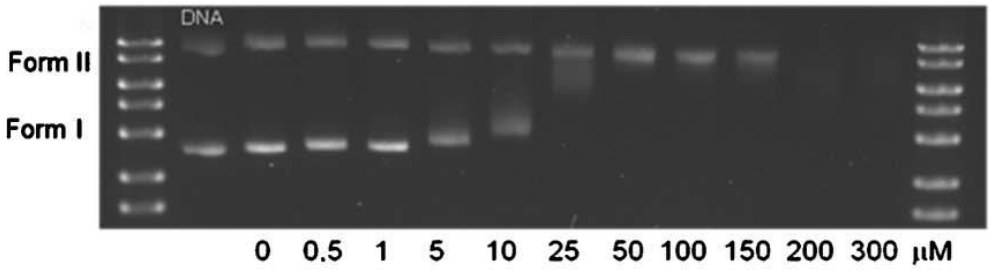
Obr. 17. Priestorové znázornenie distorzie DNA vplyvom cisplatiny.

5.2 Určenie odvíjaceho uhla platinových derivátov

K určeniu odvíjaceho uhla DNA sa využíva plazmidová DNA, ktorá sa v natívnom stave prevažne nachádza v superhelikálnom stave s negatívnou superhelicitou σ. Pre plazmidy vyizolované z mezofilných baktérií je hodnota tejto veličiny okolo -0.052.

V plazmidovej superhelikálnej DNA je počet celkového prekríženia jedného vlákna druhým daná hodnotou Lk, linking number. Ten je súčtom hodnôt Tw a Wr, twisting a writhing number, resp. DNA Tw= N_{bp}/h, pričom N je počet párov báz v DNA a h je helikálny parameter. h= 10.5 ± 0.5 bp/na otáčku v DNA. Wr je počet superhelikálnych otáčok v plazmidovej DNA. Superhelicita σ je definovaná nasledovne: $\sigma = \Delta Lk/Lk_0$, čo je približne Wr/Tw. Potom sa dá jednoducho ukázať, že pre odvíjací uhol α platí:

$\alpha = 18.\sigma.r_b$, pričom r_b je molárny pomer medzi platinou a bázami DNA (nie bázovými pármi!), kde dochádza ku koalescencii pohyblivostí medzi ocDNA a scDNA, Obr.18. [Keck a Lippard 1992].



Obr. 18. Vplyv cisplatiny na pohyblivosť plazmidovej DNA, pohyblivosť superhelikálnej formy scDNA reprezentuje Forma I a relaxovanú ocDNA formu reprezentuje Forma II. Pri koncentrácii 50 µmol.L^{-1} cisplatiny dochádza ku zjednotení pohyblivostí oc formy a sc platinovanej formy, tzv. koalescencii.

5.2.1 Úloha

Stanovte odvíjací uhol cisplatiny plazmidu pUC19 pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. Plazmid inkubujte v roztokoch s rôznou koncentráciou cisplatiny v rozsahu od 0-200 µmol.L^{-1}.

6 Extrakcia histónov z jadier pečene

Históny sú zásadité jadrové proteíny, ktorých hodnota izoelektrického bodu je vyššia ako 9 a ich relatívna molekulová hmotnosťou je 11 kD až 21,5 kDa**.** To znamená, že sa dobre viažu so záporne nabitou molekulou DNA. Ich zásaditosť spočíva v nadbytku povrchových lyzínových a arginínových aminokyselinových zvyškov v porovnaní s kyslými aminokyselinami. Odlišujú sa navzájom pomerným zastúpením jednotlivých aminokyselín. Všetkým histónom chýba tryptofán a s výnimkou histónu H_3 aj cysteín. Históny sa rozdeľujú do viacerých tried, napríklad:

1. **históny bohaté na lyzín** – H_1, pomer zastúpenia lyzínu k arginínu (L : A) dosahuje hodnotu 22. H_1 má najvyššiu molekulovú hmotnosť - 21 kDa, pozostáva z 215 aminokyselinových zvyškov,
2. **históny s miernym nadbytkom lyzínu** – H_2 , pomer L : A je 1,2. V H_2b, L : A = 2,5. Okrem arginínu a lyzínu má aj vyšší obsah serínu,
3. **históny bohaté na arginín -** H_3, L : A = 0,72. Charakteristická je aj prítomnosť cysteínu, ktorý ostatným frakciám chýba. - H_4, L : A = 0,79. Má najnižšiu molekulovú hmotnosť – 11,3 kDa, pozostáva zo 102 aminokyselinových zvyškov.

Sekvencia aminokyselín v H_4 je vysoko konzervovaná. Tento histón obsahuje 102 aminokyselín. Sekvencia H_4 z teľacieho týmusu s homológnym H_4 z mladého hrachu sa líši len v dvoch aminokyselinách: valín v 60. polohe je v hrachu nahradený izoleucínom a lyzín v 77. polohe arginínom. Navyše v H_4 hrachu nie je lyzín v 20. polohe metylovaný. Dosiaľ nie je známe, že by si nejaký iný proteín v prírode zachoval taký vysoký stupeň homológie medzi tak vzdialenými druhmi. Táto homológia H_4 je dôsledkom toho, že tento proteín má vo všetkých organizmoch rovnakú fyziologickú funkciu.

V protiklade s H_4 má H_1 pomerne širokú druhovú špecificitu. Histón H_3 z teľacieho týmusu obsahuje 135 aminokyselín, z ktorých medzi prvými 53 sa vyskytuje 18 zásaditých. Ukázalo sa, že práve táto doména je zodpovedná za väzbu s molekulou DNA. Druhá časť molekuly H_3 má hydrofóbny charakter.

Históny, najmä H_1, sú považované za **represory transkripcie génov** a hlavnými aktérmi pri **epigenetickej regulácii génovej expresie.** Históny pokrývajú molekulu DNA, takže sa stáva neprístupnou pre mnohé transkripčné faktory a RNA polymerázu. To znamená, že komplex histónov s DNA má zníženú schopnosť transkripcie príslušných génov.

3D štruktúra histónu H_1 má nízky stupeň špiralizácie**,** pretože má dlhšie úseky s rovnakým nábojom a obsahuje väčšie množstvo prolínu. V ostatných typoch histónov α - štruktúru tvorí takmer tretina molekuly. Pre históny je charakteristické nerovnomerné rozmiestnenie zvyškov lyzínu a arginínu pozdĺž polypeptidového reťazca. V H_1 sú sústredené na C – konci a v ostatných typoch sú koncentrované v N-terminálnej oblasti. Terminálne oblasti sú flexibilné. Prostredníctvom posttranslačných modifikácií sú zapojené do takých dôležitých procesov, ako je aktivácia transkripcie, uvoľnenie histónov z oblasti replikačnej vidlice pri replikácii DNA a zámena histónov počas spermiogenézy. Nepolárne zvyšky aminokyselín sú sústredené hlavne v stredných častiach proteínu, kde vytvárajú globulárne domény**.**

V molekulách histónov H_2a, H_2b, H_3 má globulárnu štruktúru aj C-terminálna doména. Tieto tri históny tvoria **histónový oktamér nukleozómu.** Syntéza histónov prebieha v interfáze. Gény kódujúce históny sú na DNA tandemovo usporiadané s veľkým počtom kópií.

Zastúpenie jednotlivých aminokyselín v jednotlivých typoch histónov ilustruje nasledujúca tabuľka:

Zastúpenie aminokyselín	**Histón**				
	H_1	**H_2a**	**H_2 b**	**H_3**	**H_4**
lyzín	28,7	12,5	16,7	10,1	9,8
histidín	0,0	2,8	2,3	2,4	1,9
arginín	1,7	9,3	6,4	13,6	13,9
ε-N-metyllyzín	0,0	0,7	0,0	0,6	1,1
kys. asparag.	2,0	5,5	4,9	4,4	5,0
treonín	5,4	4,9	6,2	6,5	6,6
serín	6,7	5,0	10,9	3,8	2,5
kys. glutámová	3,4	8,7	7,6	10,2	6,2
prolín	10,1	4,1	4,8	4,4	1,3
glycín	6,9	9,0	5,6	5,8	15,9
alanín	26,1	13,2	10,2	13,5	7,5
cysteín	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
valín	4,1	6,0	7,1	4,6	7,8
metionín	0,0	0,3	1,6	1,5	1,0
izoleucín	0,8	4,2	4,9	4,8	5,6
leucín	4,1	10,1	4,9	9,0	8,0
tyrozín	0,5	2,3	3,8	2,1	3,5
fenylalanín	0,5	1,0	1,6	2,0	2,2
tryptofán	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Modifikácie histónov

Históny podliehajú určitým chemickým modifikáciám, ktoré výrazne ovplyvňujú ich vlastnosti a v konečnom dôsledku aj expresiu génov. Dynamická chemická modifikácia histónov je jedným z faktorov epigenetickej regulácie expresie génov.

1. ***Acetylácia*** nastáva na aminoskupine N terminálneho serínu alebo lyzínu v N terminálnej oblasti histónov H_2a, H_2b, H_3 a H_4, Na jednej molekule môžu byť acetylované 1 - 4 skupiny. Acetyláciou sa neutralizuje náboj zvyškov lyzínu, čím sa znižuje schopnosť histónu stabilizovať štruktúru chromatínu a DNA sa stáva citlivejšou na pôsobenie Dnázy I. Stupeň acetylácie sa zvyšuje pri prechode chromatínu z inaktívneho do transkripčne aktívneho stavu. Na druhej strane deacetylácia nastáva pri zvyšovaní kompaktnosti chromatínu, k čomu dochádza najmä po replikácii DNA.
2. ***Fosforylácia*** prebieha na hydroxylovej skupine serínu a treonínu na niektorých miestach molekúl histónov H_1, H_2 a H_3. Fosforylácia histónu H_1 ovplyvňuje kondenzáciu chromatínu, nastáva tesne pred mitózou a pravdepodobne sa tým začína proces mitózy. Fosforylácia ovplyvňuje terciálnu štruktúru aj ostatných frakcií histónov.
3. ***Metylácia*** prebieha na niektorých zvyškoch lyzínu histónov H_1, H_3 a H_4, súvisí s aktiváciou genómu. Metylácia sprevádza represiu génu, kým demetylácia génovú expresiu.
4. ***ADP - ribozylácia*** spočíva v pripojení ADP - ribozylu na aminoskupiny histónov, čím dochádza k ovplyvneniu interakcie histónov s DNA**,** teda aj stav chromatínu.
5. *Ďalšia modifikácia* histónu spočíva v naviazaní proteínu **ubikvitínu** na molekulu histónu H_2a. Takáto modifikovaná forma je zložkou nukleozómov a označuje sa termínom proteín A24.

Históny majú dôležitú štruktúrnu úlohu pri usporiadaní DNA v chromatíne a stabilizácii molekúl DNA. Naviazanie histónu spôsobuje zmenu priestorovej štruktúry DNA pri vzniku komplexného útvaru, tzv. nukleohistónu. Štruktúrnymi jednotkami chromatínu sú nukleozómy. Pozostávajú z histónového jadra, okolo ktorého sa otáča DNA. Jadro nukleozómu má diskový tvar, jeho šírka je 10 - 11 nm, výška 6 nm. Predstavuje ho histónový oktamér, tvorený z dvoch molekúl H_2 a, H_2 b, H_3 a H_4. Profil nukleozómu sa tvorí podľa tetraméru pozostávajúceho z dvoch molekúl H_3a dvoch molekúl H_4 histónu, na ktorý sa prikladajú z dvoch strán diméry H_2a a H_2b.

6.1 Princíp izolácie histónov

Princíp izolácie histónov z rôznych tkanív bol popísaný už pred mnohými rokmi mnohými autormi [Weiss a kol. 1991]. Bunkové jadrá môžeme izolovať z čerstvej alebo zmrazenej

pečene. Pred izoláciou sa musí tkanivo rozrušiť. Ak bolo tkanivo zmrazené, bunky disociujú až po jemnej homogenizácii. Na rozrušenie tkaniva sa používajú homogenizátory. Homogenizátor sa skladá z hrubostenného okalibrovaného valca s guľatým dnom, v ktorom rotuje sklenený alebo teflónový piest poháňaný elektrickým motorom. Pri tomto spôsobe homogenizácie sa mení tkanivo a bunky na homogénnu suspenziu *subcelulárnych častíc,* ktoré sa potom izolujú diferenciálnou centrifugáciou, prípadne centrifugáciou v hustotných gradientoch. Homogenizácia sa musí robiť vo vhodnom médiu, ktoré zaručuje maximálnu biochemickú a morfologickú stabilitu subcelulárnych častíc. Izolačné média by mali mať vhodné pH, iónovú silu, a taktiež by mali prípadne obsahovať aj niektoré ochranné a stabilizujúce látky. Medzi najpoužívanejšie média pri izolácii hepatocytov patrí tzv. roztok **STKM** obsahujúci sacharózu, Tris , KCl, $MgCl_2$ a **STC** (sacharóza, Tris, $CaCl_2$). Na dosiahnutie čo najlepšieho rozbitia bunkových stien a membrán sa do roztoku STKM pridáva aj povrchovo aktívna látka napr. Triton X-100 (výsledná koncentrácia 0,01 - 0,1 %). Triton zvyšuje solubilizáciu biomolekúl viazaných na membrány, proteínov vrátane enzýmov, avšak môže zapríčiňovať ich čiastočnú denaturáciu a inhibíciu enzýmovej aktivity.

Históny sa získavajú z chromatínu cestou extrakcie zriedenými kyselinami (napr. 0,25 M HCl alebo H_2S0_4), alebo koncentrovanými roztokmi solí (2 M NaCl). Pri použití kyselín roztok má mať dostatočnú aciditu na potlačenie disociácie fosfátových skupín DNA, ktorá musí byť dosť nízka na to, aby históny ostali rozpustené. Pri *kyslej extrakcii* sa históny rozpúšťajú a nehistónové bielkoviny a nukleové kyseliny sa dajú oddeliť centrifugáciou. Pri extrakcii koncentrovanými soľnými roztokmi dochádza k disociácii chromatínu, avšak po nej je nutné históny niekoľkokrát premyť.

6.2 Pracovný postup

Potrebné roztoky a chemikálie: 0,2 $mol.L^{-1}$ H_2SO_4, 96 % etanol, acetón, 0,1 % Triton X-100, destilovaná voda

STKM: 0,25 $mol.L^{-1}$ sacharóza, 50 m $mol.L^{-1}$ Tris, 25 $mmol.L^{-1}$ KCl, 5 $mmol.L^{-1}$ $MgCl_2$

STC: 0,34 $mol.L^{-1}$ sacharóza, 100 $mmol.L^{-1}$ Tris, 2 $mmol.L^{-1}$ $CaCl_2$

vzorkový roztok: 0,9 mol.L^{-1} kyselina octová, 5 M močovina ,

Ďalšie pomôcky a nástroje:

Homogenizátor s teflónovým piestom, centrifugačné skúmavky, tyčinky, centrifúga, spektrofotometer

1. K extrakcíi histónov je potrebné množstvo hepatocitov približne 1 g. Odvážené množstvo pečene homogenizujeme homogenizátorom v roztoku STKM pri 1000 rpm v celkovom objeme 9 mL približne počas 2 - 5 minút. Najprv homogenizujeme iba s polovicou objemu STKM a až potom pridávane ostatnú časť za súčasného oplachovania homogenizačného piestu. Centrifugujeme 10 minút pri 2 500 rpm. Supernatant sa odstráni a k sedimentu sa pridá 9 mL roztoku STKM. Opatrne premiešavame a následne suspenziu centrifugujeme 10 minút pri 2 500 rpm. Supernatant opäť vylejeme a k sedimentu pridáme 9 mL roztoku STKM a 0,1 % Triton X-100 a dobre premiešame. Triton X-100 je neiónogénny detergent, ktorý má pri nízkych koncentráciach dobrý degeneračný účinok, preto sa jadrá z buniek ľahšie uvoľňujú. Centrifugujeme 10 minút pri 2 500 rpm. Supernatant sa odstráni a k sedimentu pridáme 9 ml roztoku STC a dobre premiešame. Centrifugujeme 10 minút pri 2500 rpm.
2. K sedimentu z jadier pridáme 3 mL 0,2 mol.L^{-1} H_2SO_4, dobre premiešame a necháme stáť v chlade (0-4 °C) 1 hodinu. Centrifugujeme 10 minút pri 3 500 - 4 000 rpm. Supernatant obsahuje aj bázické histónové proteíny, opatrne ho zlejeme do označených skúmaviek. Históny zrážame 4-násobným objemom vychladeného 96 % etanolu. Necháme stáť v chlade 1 hodinu (-5 – 0 °C). Vyzrážané históny rozmiešame a prelejeme do označených centrifugačných skúmaviek a centrifugujeme 10 minút pri 4 000 rpm. Supernatant odstránime. Sediment premyjeme vychladeným acetónom.
3. Získané históny rozpustíme v 1 mL vzorkového roztoku. Vzorky analyzujeme na absorpčnom UV-Vis spektrofotometri pri minimálne 10 - násobnom riedení (0,2 mL vzorky + 1,8 mL destilovanej vody). Referencia je 0,2 ml vzorkového tlmivého roztoku a 1,8 mL destilovanej vody. Absorbanciu vzoriek stanovíme v ultrafialovej oblasti pri vlnových dĺžkach 230, 260 a 280 nm. Výpočty sa robia z hodnoty A_{230} na základe porovnania s absorbanciou vzorky so známou koncentráciou bielkovín (proteínový štandard). Hodnoty A_{260} a A_{280} slúžia na kontrolu čistoty: Pomer A_{230} / A_{260} by nemal byť menší ako 7 a pomer A_{230}/ A_{280} by nemal byť menší ako 6. Ďalšiu časť vzorky podrobíme elektroforetickej analýze.

4. Pripravíme si zmes na nanášanie vzoriek do eletroforetických komôrok. Zmes obsahuje 100 µL vyizolovanej vzorky histónov, 50 µL 10 % glycerolu, 5 µL brómfenolovej modrej a 5 mol.L^{-1} močoviny.

5. Zmes separujeme v kyslých podmienkach vzorkového roztoku, v ktorom bol pripravený aj 12 % polyakrylamidový gél.

Vyhodnotenie:

Štandardný cytochróm: Mr = 13 kDa, dimér cytochrómu: Mr = 26 kDa Históny: H1 = 21 - 22 kDa, H2a = 14,5 –15 kDa, H2b = 13,7 kDa, H3 = 15,3 kDa, H4 = 11,3 kDa.

6.1.1 Úlohy

1. Izolácia z jadier pečene
2. Extrakcia histónov
3. Kvantitatívne stanovenie histónov a stanovenie čistoty histónov

7 Použitá literatúra

1. T.E. Creighton, Protein structure a practical approach, Oxford Univ. Press, Oxford, 1997
2. C.E. Depuydt, G.A.V. Boulet, C.A.J. Horvath, I.H. Benoy, A.J. Vereecken, J.J. Bogers, J. Cell. Mol. Med. 11, 2007, 881-891
3. M. Ferenčík, B. Škárka, Biochemické laboratórne metódy, Alfa Bratislava, 1981
4. K. Fraige, R.F. Travensolo, E. Carrilho, (2013) Braz. Arch. Biol. Tech. 56, 2013, 213-221
5. J. Jaumot, R. Gargallo, Curr. Pharm. Design 18, 2012, 1900-1916
6. X. Chen, T. Baumstark, G. Steger, D. Riesner, Nucleic Acids Res. 23, 1995, 4524 -4525
7. M.V. Keck a S.J. Lippard, J. Am. Chem. Soc. 114, 1992, 3386-3390
8. S.M. Kelly, N.C. Price, Curr. Protein Pept. Sci. 1, 2000, 349-384
9. J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence spectroscopy, 3rd. Edition, Springer, 2006
10. L.S. Lerman, S.G. Fisher, I. Hurley, K. Silverstaine, N. Lumelsky, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 13, 1984, 399-423
11. M. Lu, B. Funsch, M. Wiese, M.J. Roggendorf, J. Gen. Virol. 76, 1995, 881-887
12. C.N. Pace, Trends Biotech. 8, 1989, 93-98
13. D. Riesner, G. Steger, R. Zimmat, R.A. Owens, M. Wagenhöfer, W. Hillen, S. Vollbach, K. Henco, Electrophoresis 10, 1989, 377-389
14. V. Rosenbaum a D. Riesner, Biophys. Chem. 26, 1987, 235-246
15. R.H. Rothman, Genetic Engeneering Laboratory Manual, 2014
16. J.F. Sambrook, D.W. Russell, ed.Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Vols 1,2 and 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
17. V. Viglasky, Methods Mol. Biol. 1054, 2013, 159-171
18. V. Viglasky, M. Antalik, J. Bagel'ova, Z. Tomori, D. Podhradsky, Electrophoresis 21, 2000[b], 850-857
19. V. Víglaský, Š. Číkoš, P. Pristaš, P. Javorský, Praktikum z biochémie nukleových kyselín; Základné techniky rekombinantnej DNA, 2000
20. D.J. Walsh, A.C. Corey, R.W. Cotton, L. Forman, G.L. Herrin, C.J. Word, D.D. Garner, J. Forensic. Sci. 37, 1992, 387-395
21. G. Weiss, H. Talasz, B. Puschendorf, Biochem. J. 280, 1991, 777-781
22. U. Wieland, H. Suhr, B. Salzberger, H.J. Eggers, R.W. Braun, J.E. Kühn, 1996, J. Virol. Method 57, 127-139
23. Y. Yamura, I.K. Satanoka, T. Fujimori, S. Maeda, T. Chiba, Dig. Dis. Sci. 39, 1994, 2043-2048

Pokročilé praktikum z biochémie a molekulovej biológie

Vysokoškolský učebný text

Autori: doc. RNDr. Viktor Víglaský, PhD.
RNDr. Petra Krafčíková, PhD.
RNDr. Erika Demkovičová

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Umiestnenie: http://unibook.upjs.sk

Dostupné od: 15.12.2017

Vydanie: prvé

Rok vydania: 2017

Počet strán: 95

Rozsah: 5,16 AH

ISBN 978-80-8152-572-8