Лекція 2

ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗ МОЛЕКУЛ ДНК

Електрофорез - метод поділу макромолекул, що відрізняються за таким параметрам, як розміри (або молекулярна маса), просторова конфігурація, вторинна структура та електричний заряд. На початку 70-тих років ХХ ст. було показано, що за допомогою гель-електрофорезу можна визначити довжину й чистоту молекул ДНК.

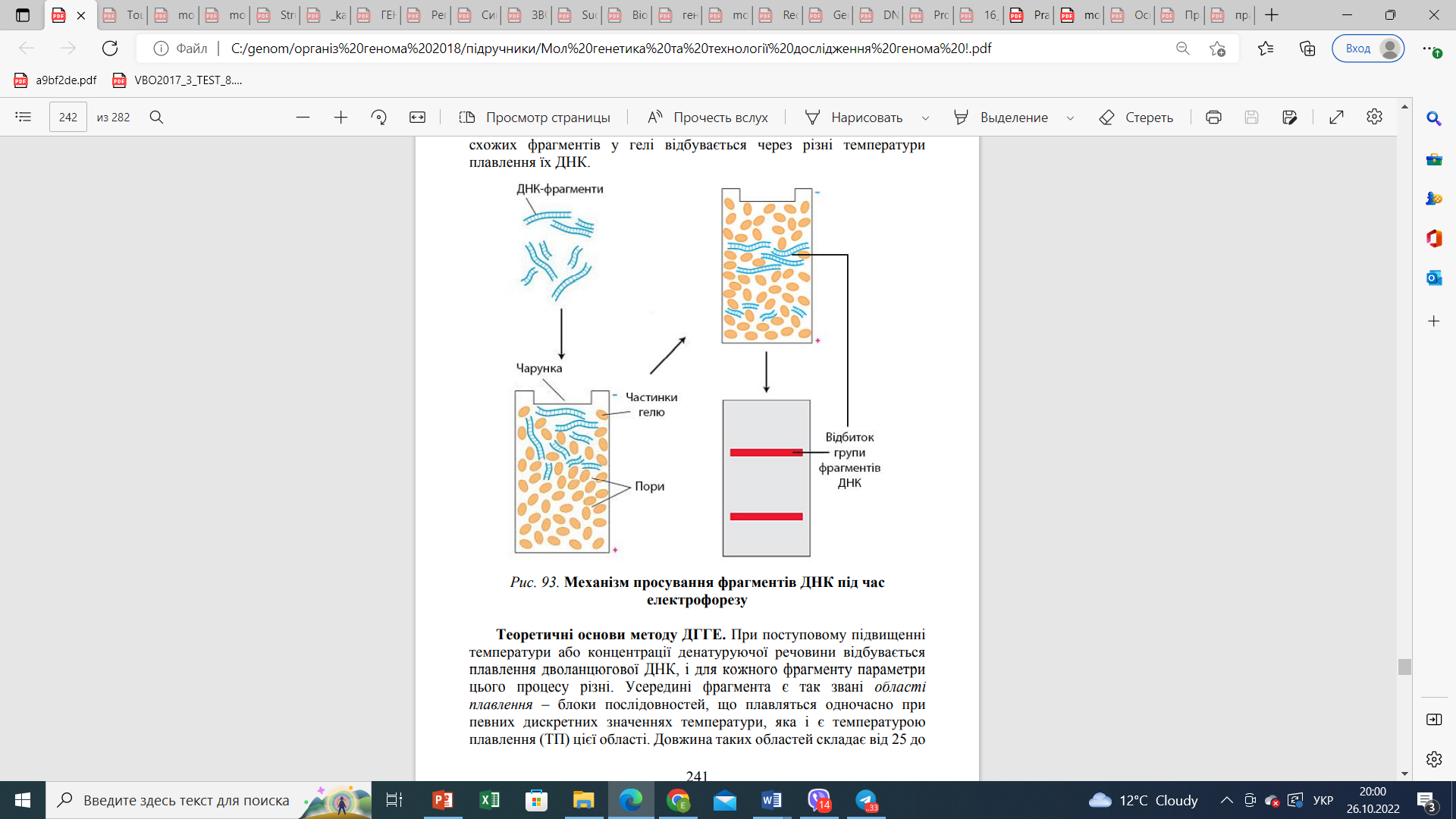
***Фізичний принцип методу.*** Макромолекули у буферному розчині мають деякий сумарний електричний зарядом, величина та знак якого залежить від рН середовища. Якщо через цей розчин, укладений у канал із ізолюючого матеріалу почати пропускати електричний струм, то вздовж каналу встановиться певний градієнт напруги, тобто сформується електричне поле. Його напруженість вимірюється різницею потенціалів по кінцях каналу, віднесеної до його довжини (В/с). Під дією поля макромолекули в відповідно до свого сумарного заряду мігрують у напрямку катода або анода, причому їх тертя про довкілля обмежує швидкість міграції. Залежно від величини заряду та розмірів молекули набувають різних швидкостей.

Поступово вихідний препарат, що складається з різних молекул, поділяється на зони однакових молекул, які мігрують з однаковою швидкістю. У сучасних приладах робочий канал заповнюють гелем, наявність сітки якого вносить важливу додаткову деталь до електрофоретичної міграцію молекул. Фракціоновані молекули стикаються з нитками полімеру, що утворює сітку гелю та знижує швидкість руху молекул. Перешкоди для міграції стають особливо серйозними, якщо середній розмір просторових осередків гелю виявляється співставимим з розмірами макромолекул. У цьому випадку вирішальний вплив на електрофоретичну рухливість різних макромолекул та ступінь поділу надає співвідношення їх лінійних розмірів.

Були розроблені спеціальні поліакриламідні гелі, за допомогою яких вдається розділити фрагменти ДНК довжиною до 500 нуклеотидів, що відрізняються навіть на один нуклеотид. Можлива навіть така ситуація, коли особливо великі молекули білків або нуклеїнових кислот взагалі не можуть «протиснутися» через пори гелю та їх міграція припинитися. Оскільки пори в поліакриламідному гелі для більших молекул ДНК занадто малі, для їхнього розділення за розміром були розроблені спеціальні гелі на основі агарози (полісахарид, що виділяють з морських водоростей). Обидва ці методи поділу ДНК широко використовуться для аналітичних і препаративних цілей.

Електрофорез в агарозному гелі – стандартний метод, що використовується для розділення, ідентифікації й очищення фрагментів ДНК. За допомогою цієї простої техніки можна швидко розділити такі суміші фрагментів ДНК, які не можуть бути розділені іншими способами, наприклад центрифугуванням у градієнті густини.

Отже, в даний час використовують поліакриламідний та агарозний гель. Варіюючи концентрацію полімеру, можна отримувати гелі з дуже широким діапазоном розмірів пор. Крім того, можна змінювати електричні заряди макромолекул шляхом варіації рН буфера, а їх конфігурацію шляхом введення у буфер денатуруючих агентів або детергентів. Все це надає методу електрофорез виняткову гнучкість. Так, в 80-тих роках ХХ ст. була запропонована модифікація гель-електрофорезу в агарозному гелі, названа електрофорезом у пульсуючому електричному полі або пульс-електрофорез. З її допомогою вдається розділяти дуже великі молекули ДНК. Звичайний гель-електрофорез не дозволяє розділити такі молекули через сталість електричного поля, що надає молекулам змієподібну конфігурацію. Маючи таку конфігурацію молекули рухаються в гелях з постійною швидкістю поза залежністю від довжини молекул. Якщо ж напрямок електричного поля буде часто змінюватися, швидкість руху молекул буде визначатися їхньою здатністю переорієнтуватися відповідно до цієї зміни.

У ході електрофорезу зони макромолекул залишаються невидимими. Для спостереження за процесом у вихідний препарат додають барвник, молекули якого несуть електричний заряд того ж знака, що і молекули, які фракціонуються. Барвник теж пересувається в електричне поле, але вже у вигляді пофарбованої зони. Його підбирають таким чином, щоб швидкість міграції найбільш рухливих макромолекул була трохи нижче, ніж у молекул барвника. Коли забарвлена ​​зона доходить до кінця гелю, електрофорез припиняють. Зони біополімерів, що розділилися уникнення їхньої дифузії негайно фіксують. Для цього гель витягають із скляної форми і вимочують у спеціальній фіксуючий суміші, в результаті чого кислоти випадають в осад у тому місці, де закінчилася їхня міграція в ході електрофорезу. Після фіксації (або одночасно з нею) проводять фарбування зон шляхом вимочування гелю в розчині барвника, що міцно зв'язується з нуклеїновою кислотою.

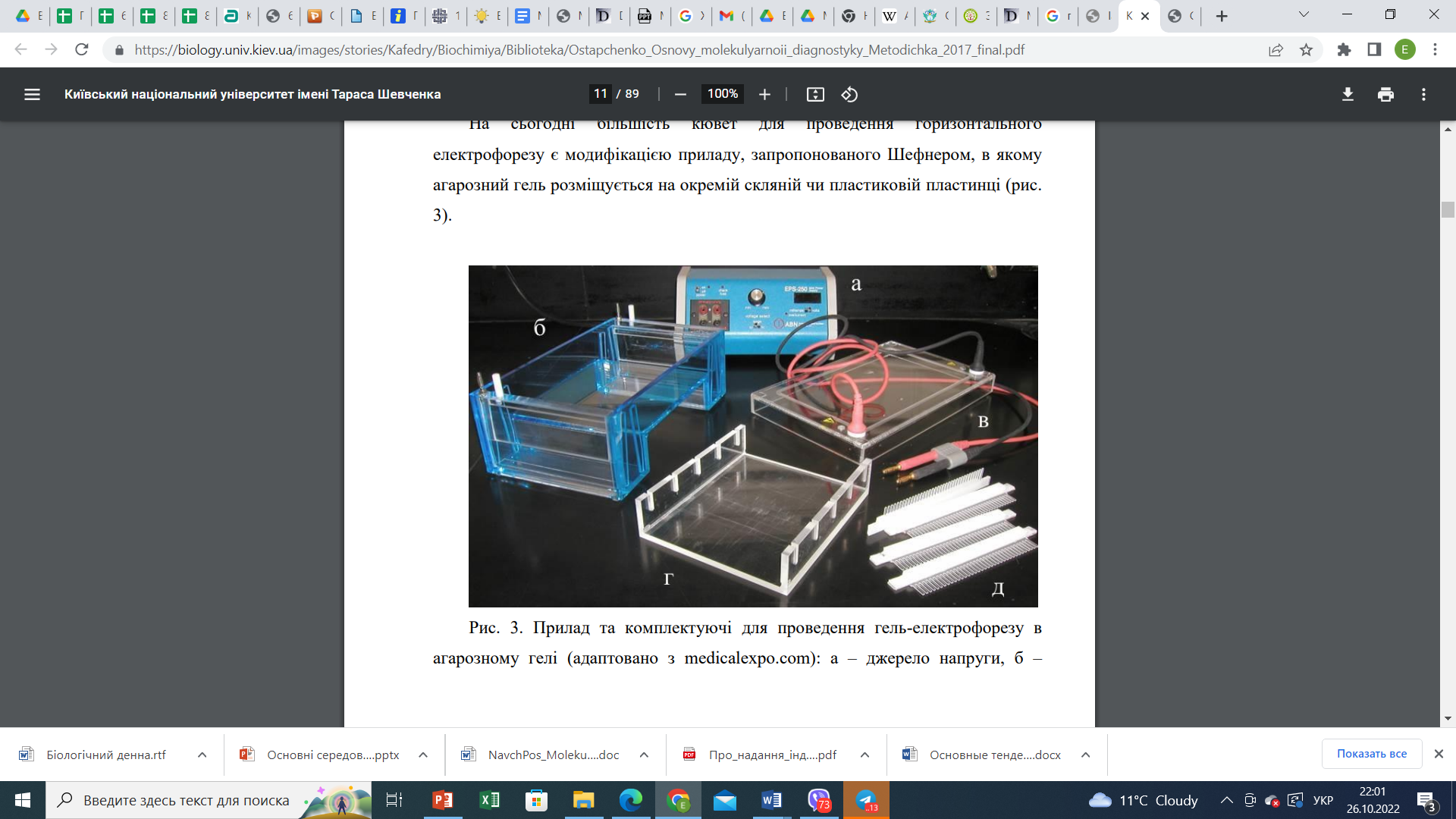
Часто використовують гелі у вигляді тонких пластин, заполімеризовані між двома плоскими скельцями. Такі пластини мають важливе значення перевага: на них можна одночасно фракціонувати кілька препаратів. Зазвичай їх вносять з одного краю гелю на рівних відстанях друг від друга. Кожен препарат поділяється в електричному полі незалежно від своїх сусідів, утворюючи свій набір зон. Крім того, оскільки гель заливають у форму для полімеризації рідким, то його концентрація, склад буфера та вміст добавок строго однакові по всьому перерізу гелю. Отже, щільність струму та напруга електричного поля також однакові. Це забезпечує строго ідентичні умови фракціонування різних препаратів та дає можливість достовірного зіставлення їх складу шляхом порівняння положення смуг у паралельних треках.

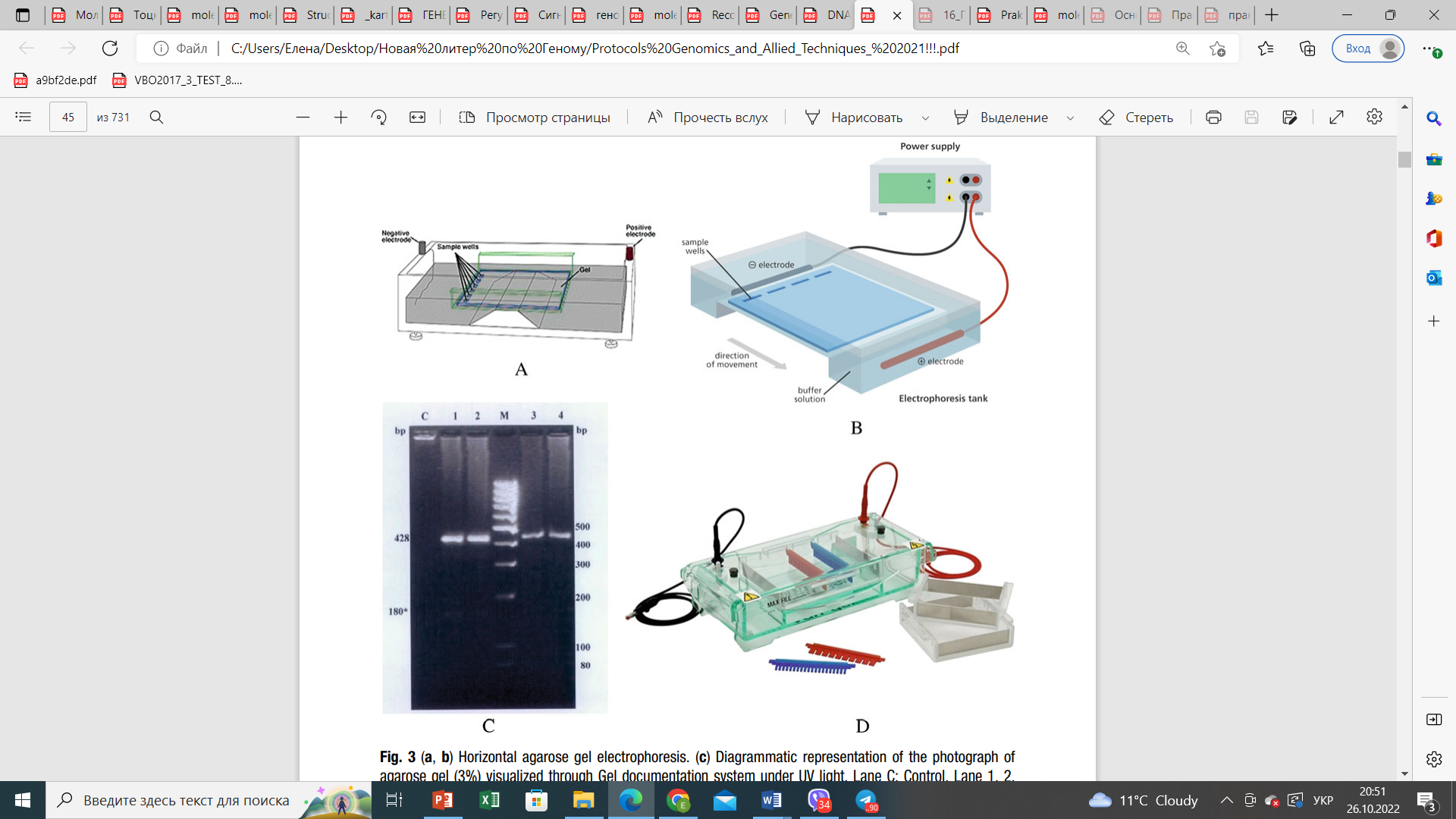
Поділ фрагментів ДНК відбувається через наявність у них заряду. Фосфатні залишки у нуклеотидів надають всій ДНК негативного заряду. Це робить її розчинною у воді і притягує її до позитивного електроду. Тому, якщо помістити ДНК в електричне поле, то вона рухатиметься від мінусу до плюсу. Фрагменти ДНК, що мають найменшу довжину, наближаються найшвидше до + електрода, тоді як довгі фрагменти залишаються максимально близько до мінуса.

Визначення розмірів виробляють шляхом порівняння з комерційно доступними фрагментами ДНК (DNA ladder, маркери), що містять лінійні фрагменти ДНК відомої довжини.

У лунки гелю наноситься проба ДНК , що вже містить індикаторний барвник. Форму з гелем, що містить нанесені зразки переносять у камеру для електрофорезу, заповнену буфером, камеру підключають до джерелу живлення (напруга 1-15 В/см довжини гелю), і проводять електрофоретичний поділ ДНК у напрямку від катода до аноду Чим нижче напруга, тим вище роздільна здатність гелю, смуги більше чіткі через меншу дифузію, але електрофорез займає більше часу.

Контроль за електрофоретичним поділом здійснюється візуально по руху смуги барвника. Після закінчення електрофоретичного поділу (коли індикаторний барвник досяг краю гелю) виймають гель з форми та переглядають в ультрафіолетовому світлі за допомогою УФ-трансілюмінатора (візуально фіксують).





Швидкість міграції ДНК через агарозний гель при електрофорезі визначається п’ятьма головними параметрами:

1. Розмір молекул ДНК. Молекули лінійної дволанцюгової ДНК переміщаються в гелі приблизно одним кінцем уперед зі швидкостями, обернено пропорційними десятковому логарифму їхніх молекулярних мас. Агарозні гелі використовуються переважно для розділення молекул із молекулярною масою більше 200 кДа.
2. Концентрація агарози.

Агароза – це особливо чиста фракція природного лінійного полісахариду агару, який одержують з морських червоних водоростей (Gracilaria, Gelidium, Ahnfeltia). Агароза – природний колоїд, утворений елементом, який повторюється, - агаробіозою, що, у свою чергу, складається з β-D-галактопіранози і 3,6-ангідрид-α-1-галактопіранози, що чергуються.Гелеутворення йде шляхом зв'язування у просторову сітку пучків ниток за рахунок водневих зв'язків між ними. Деякі види агарози утворюють міцні гелі вже за концентрації 0.3%. При температурах 84-96 ºС (а у спеціальних типів – вже при 70 ºС) розчин агарози переходить у прозору рідину - "плавиться". Розчини агарози тверднуть, утворюючи гель при значно нижчих температурах (36-42 ºС). Розплавлену агарозу попередньо охолоджують до 50-55 ºС і вже при цій температурі заливають у форми; це зручно і не пов'язано з виникненням значних теплових деформацій.

Агароза – полісахарид, який утворює гелі з порами від 100 до 300 нм в діаметрі, причому розмір пор залежить від концентрації агарози у гелі. Фрагменти ДНК даного розміру переміщаються в гелі, що містить різні концентрації агарози, з різними швидкостями. Таким чином, застосовуючи гелі різних концентрацій, можна розділити великий набір фрагментів ДНК, що відрізняються за розміром.

|  |  |
| --- | --- |
| Кількість агарози в гелі, % | Область ефективного поділу лінійних молекул ДНК, kb |
| 0,3  0,6  0,7  0.9  1,2  1,5  2,0 | 60-5  20-1  10-0,8  7-0,5  6-0,4  4-0,2  3-0,1 |

1. Конформація ДНК. ДНК, що мають однакову молекулярну масу, але різні конформації, наприклад кільцева неушкоджена (форма I), кільцева з одноланцюговим розривом (форма II) і лінійна (форма III), рухаються в агарозному гелі з різними швидкостями. Відносна рухливість трьох зазначених форм залежить головним чином від концентрації агарози в гелі, а також і від таких факторів, як сила току, іонна сила буфера або густина надспіральних витків у формі I. В одних умовах форма I переміщається швидше, а в інші – повільніше, ніж форма III. Найчастіше лінійна форма (форма III) мігрує повільніше за всі інші. Суперспіралізована ДНК (форма I) зазвичай мігрує найшвидше.
2. Напруга електричного поля. При низьких показниках швидкість переміщення фрагментів лінійної ДНК пропорційна прикладеній напрузі. Однак зі збільшенням напруги електричного поля рухливість фрагментів ДНК із високою молекулярною масою диференціально збільшується. Отже, зі збільшенням напруженості область ефективного поділу ДНК в агарозному гелі знижується. Максимальний поділ фрагментів відбувається при напрузі, що не перевищує 5 В/см.
3. Склад нуклеїнових основ і температура. Електрофоретична поведінка ДНК в агарозних гелях слабо залежить від складу основ ДНК або температури гелю. В агарозних гелях в області температур від 4 до 30º С зміни відносної електрофоретичної рухливості фрагментів ДНК різного розміру не спостерігається. Зазвичай електрофорез в агарозних гелях проводять при кімнатній температурі. Однак слід зазначити, що гелі, що містять менш 0,5% агарози, дуже м’які, тому з ними краще працювати при 4º С – у цих умовах вони стають більше щільними.

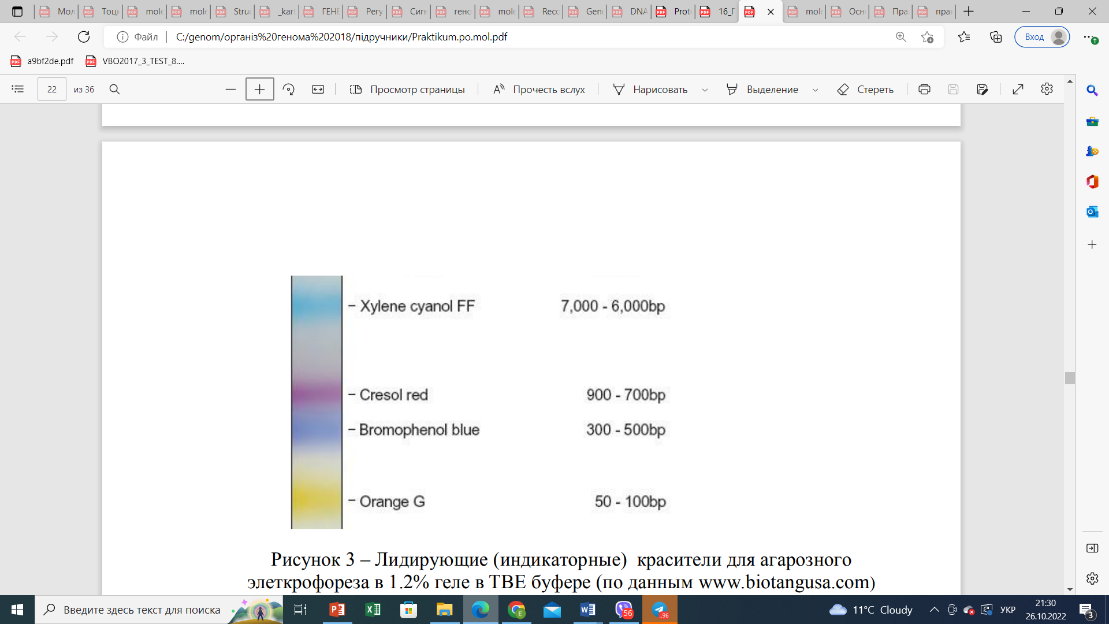
**Буфери**

Нуклеїнові кислоти мають значний за величиною негативний заряд, величина якого мало залежить від рН довкілля, а відношення заряду до маси практично однаково у всіх нуклеїнових кислот. Тому фракціонування відбувається за рахунок відмінності в розмірах молекул. Вибір **електрофорезного буфера** у цій ситуації не грає істотної ролі. Зазвичай буфери містять ЕДТА (рН 8,0) і Тris-ацетат (**ТАЕ**), Тris-борат (**ТВЕ**), або Тris-фосфат (**ТРЕ**) концентрацією приблизно 50 мМ (рН 7,5 – 7,8). Найчастіше їх готують у вигляді концентрованих розчинів і зберігають при кімнатній температурі.

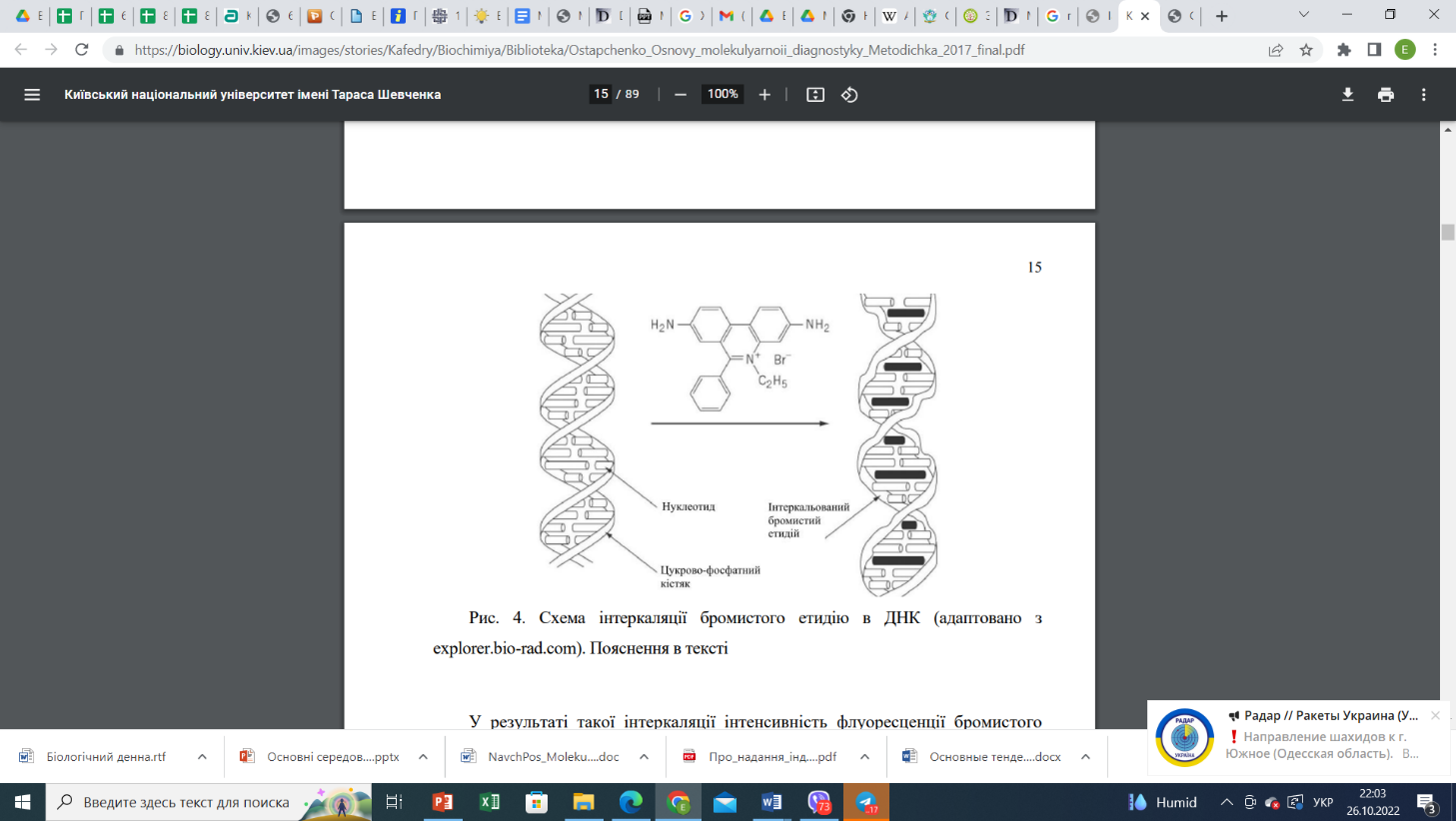
Розчин ДНК в лунки гелю вносять в іншому буфері високої густини (***буфер для завантаження****, loading buffer, LB*), що містить гліцерин або сахарозу, щоб ДНК відразу опустилася на дно лунки, а не розчинилася в електрофорезному буфері ще до включення струму і входження в гель. Буфер містить також барвники, що дозволяє легко візуально стежити за електрофорезом. Барвник у буфері потрібний лише для того, щоб зразок був легко помітний у лунці й у гелі.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Тип буфера | Буфер (6Х) | Температура хранения |
| I | 0,25% бромфенолового синього, 0,25%  ксилолціанола, 40% (мас/об’єм) сахарози в Н2О | 4оС |
| II | 0,25% бромфенолового синього, 0,25%  ксилолціанола, 15% фикола (тип 400) в Н2О | кімнатна |
| III | 0,25% бромфенолового синього, 0,25% ксилолціанола, 30% гліцерину в Н2О | 4оС |
| IV | 0,25% бромфенолового синього, 40% (об’єм/вага) сахарози в Н2О | 4оС |

**Фарбування ДНК в агарозних гелях**

При електрофорезі використовується два типи барвників (лідируючі та флюоресцентні). Як **лідируючі барвники** використовують бромфеноловий синій, помаранчевий G, червоний крезоловий, ксиленціанол. Ці барвники рухаються в тому ж напрямі як і ДНК, але з різною швидкістю. Знаючи розмір ДНК продукту, можна оцінити його положення в гелі за положенням індикатор барвників.

Для детекції ДНК у гелі використовуються різні **флюоресцентні. барвники**, які здатні зв'язуватися з дволанцюжковою ДНК і світитися в ультрафілетовому світлі. На сьогоднішній день використовуються різні барвники, які різняться за чутливістю, вартістю та безпекою. Ці барвники можуть бути додані безпосередньо в гель, і тоді гель відразу можна переглядати у трансілюмінаторі. Альтернативно, гель можна фарбувати після проведення електрофорезу у водному розчині барвника. Так як усі барвники здатні зв'язуватися з ДНК, вони є канцерогенами, і при роботі з ними використовуються рукавички.

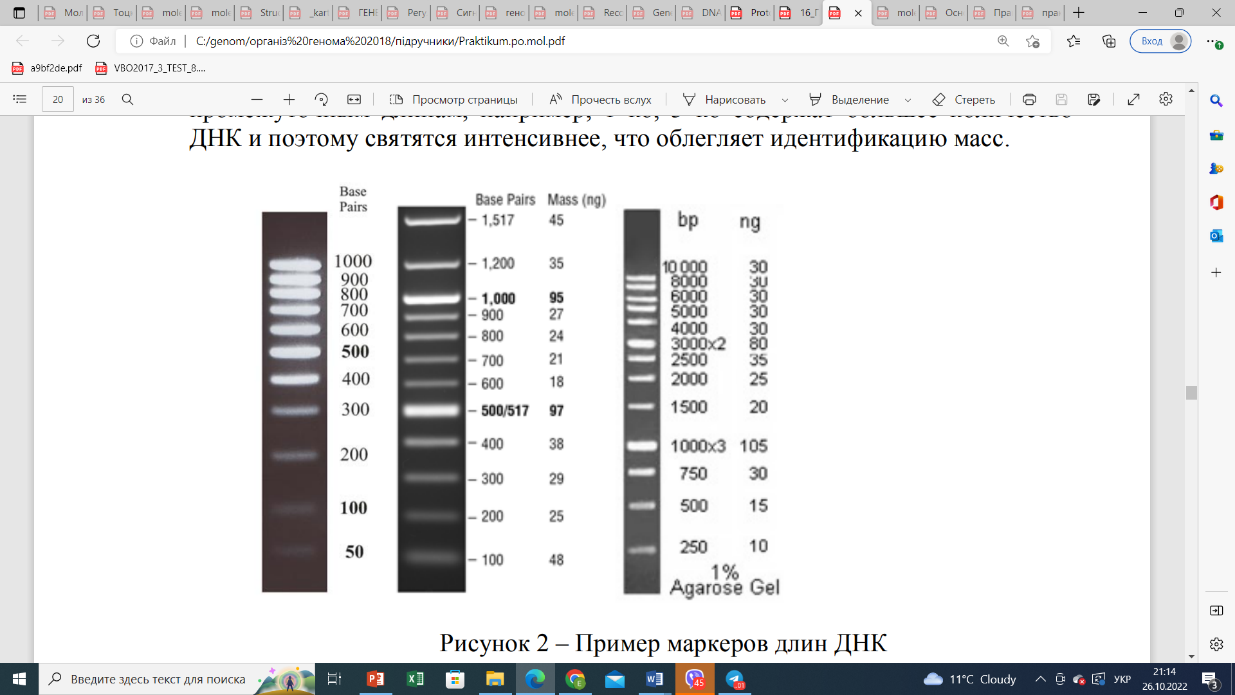
Найбільш зручний метод візуалізації ДНК в агарозних гелях – фарбування її флуоресціюючим барвником *бромистим етидієм*. Молекула цієї речовини містить плоску групу, що інтеркалює між сусідніми основами ДНК. У результаті такої інтеркаляції в безпосередній близькості від основ барвник зв’язується із ДНК, що супроводжується збільшенням інтенсивності флуоресценції. УФ-випромінювання, що поглинає ДНК в області 260 нм і передає на барвник (або ж випромінювання, що поглинається самим барвником при довжинах хвиль 302 й 366 нм), випускається потім у червоно-жовтогарячій області видимого спектра (590 нм).

Бромистий етидій можна використовувати для виявлення як дво-, так й одноланцюгових нуклеїнових кислот (ДНК і РНК). Однак спорідненість барвника до одноланцюгової ДНК набагато менша, ніж до дволанцюгової ДНК; тому флуоресценція в першому випадку є більш слабкою.

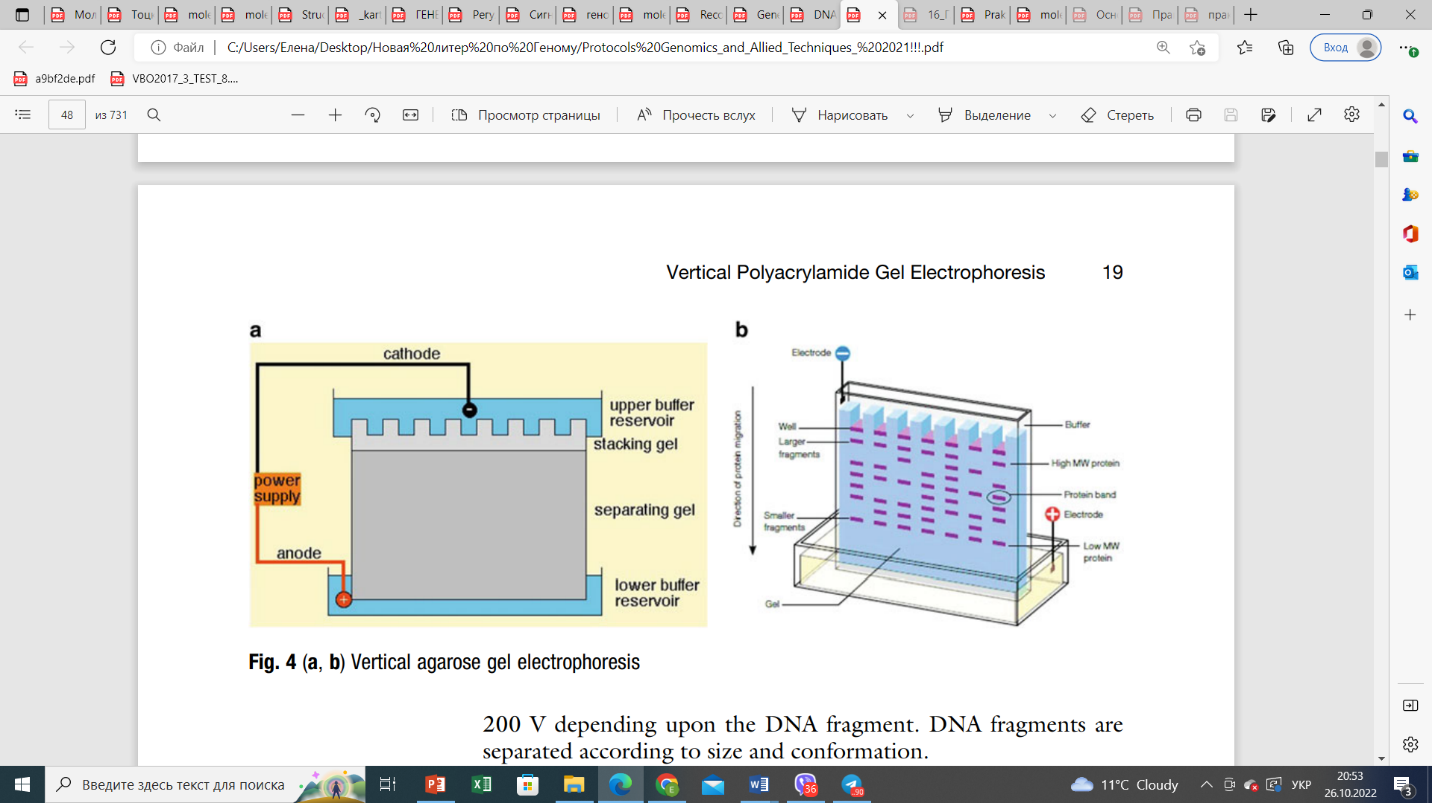
Зазвичай бромистий етидій (0,5 мкг/мл) додають і у гель, і в електрофоретичний буфер. У його присутності електрофоретична рухливість лінійної дволанцюгової ДНК знижується приблизно на 15%, але зате при цьому з’являється можливість спостерігати за процесом поділу безпосередньо під джерелом УФ-випромінення під час або наприкінці поділу. Можна також проводити електрофорез за відсутності бромистого етидія й забарвлювати ДНК уже після завершення поділу. В останньому випадку поміщають в розчин бромистого етидію на 45 хв при кімнатній температурі.

**SYBR Green I** є одним з найбільш чутливих барвників, застосовуваних для детекції дволанцюгових молекул ДНК при електрофорезах в агарозних та поліакриламідних гелях. Чутливість цього барвника приблизно в 25 разів вище, порівняно з найбільш поширеним до теперішнього часу бромистим етидієм (EtBr). При використанні трансілюмінатора з довжиною хвилі 300 нм, за допомогою SYBR Green I може бути детектовано 60 пг дволанцюгової ДНК. Крім цього, SYBR Green I з успіхом може застосовуватися при фарбуванні синтетичних олігонуклеотидів у поліакріамідних гелях, при цьому його чутливість вище, ніж у EtBr у 50-100 разів.

Барвник **Midori Green** відноситься до нового безпечного класу барвників, які застосовуються для візуалізації дволанцюгових і одноланцюгових молекул ДНК, а також молекул РНК в агарозному гелі. Він використовується з блакитним світлом у гельдокументуючих системах, а також із звичайними ультрафіолетовими трансілюмінаторами. Піки довжини хвилі збудження при цьому виходять 290 нм та 490 нм, пік емісії – 530 нм. Барвник Midori Green Direct не є канцерогеном і в набагато меншою мірою володіє мутагенними властивостями, ніж бромистий етидій. Крім того, Midori Green Direct не пошкоджує латексні рукавички та мембрану клітин та відносно безпечний для навколишнього середовища.

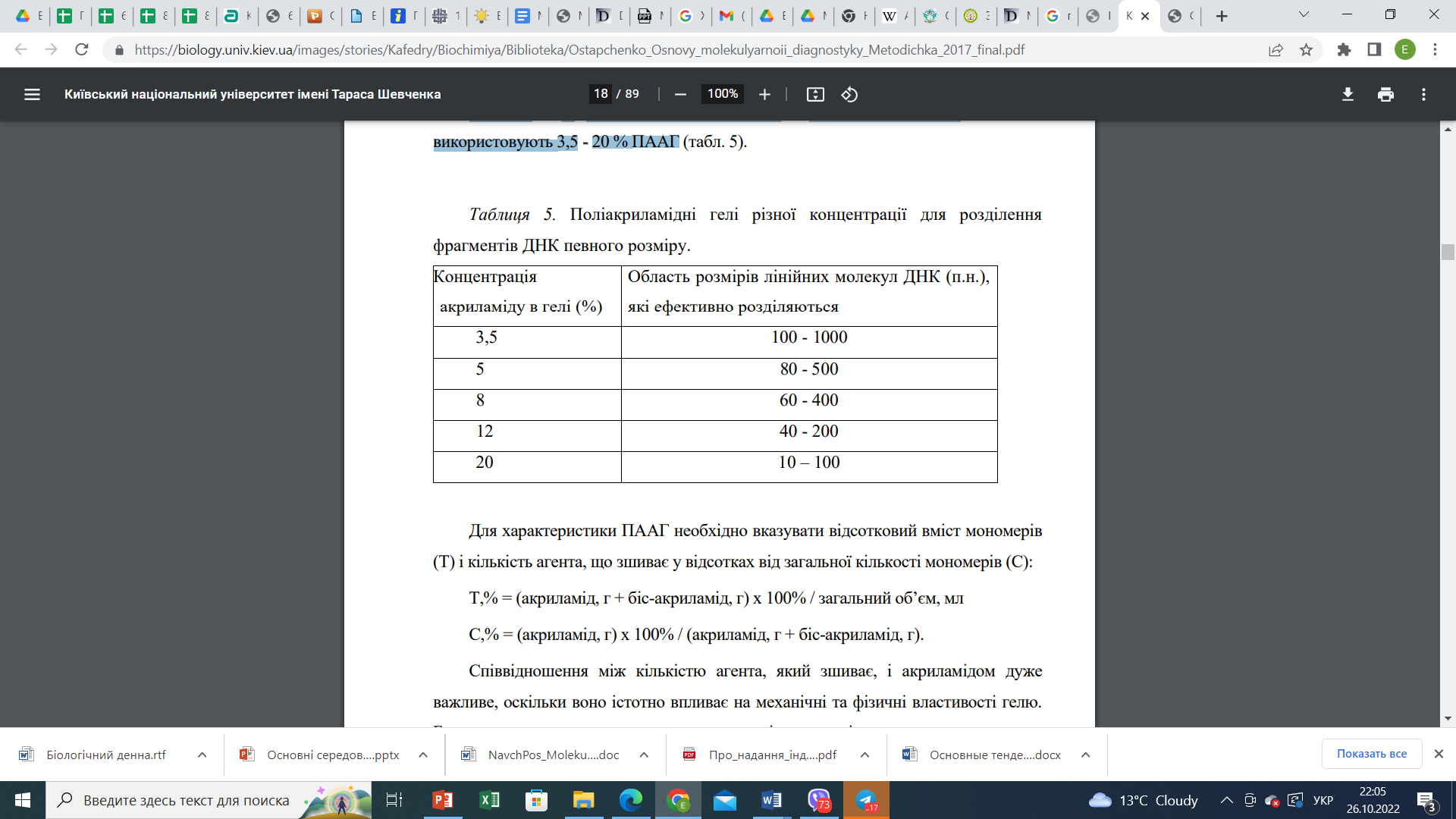
***Маркери довжини.*** У багатьох випадках електрофорезу буває бажано оцінити молекулярні розміри фракціонованих нуклеїнових кислот. Для цього зручно мати набір молекул того самого типу, але відомої довжини. В даний час є велика кількість комерційних маркерів на основі фагу лямбда або DNA ladders, що дають при електрофорезі ряд послідовних смуг на треку, які відповідають фрагментам певної маси. У багатьох комерційних препаратах смуги відповідають деяким проміжним довжинам, наприклад, 1 кб, 3 кб, містять більшу кількість ДНК і тому святяться інтенсивніше, що полегшує ідентифікацію мас.

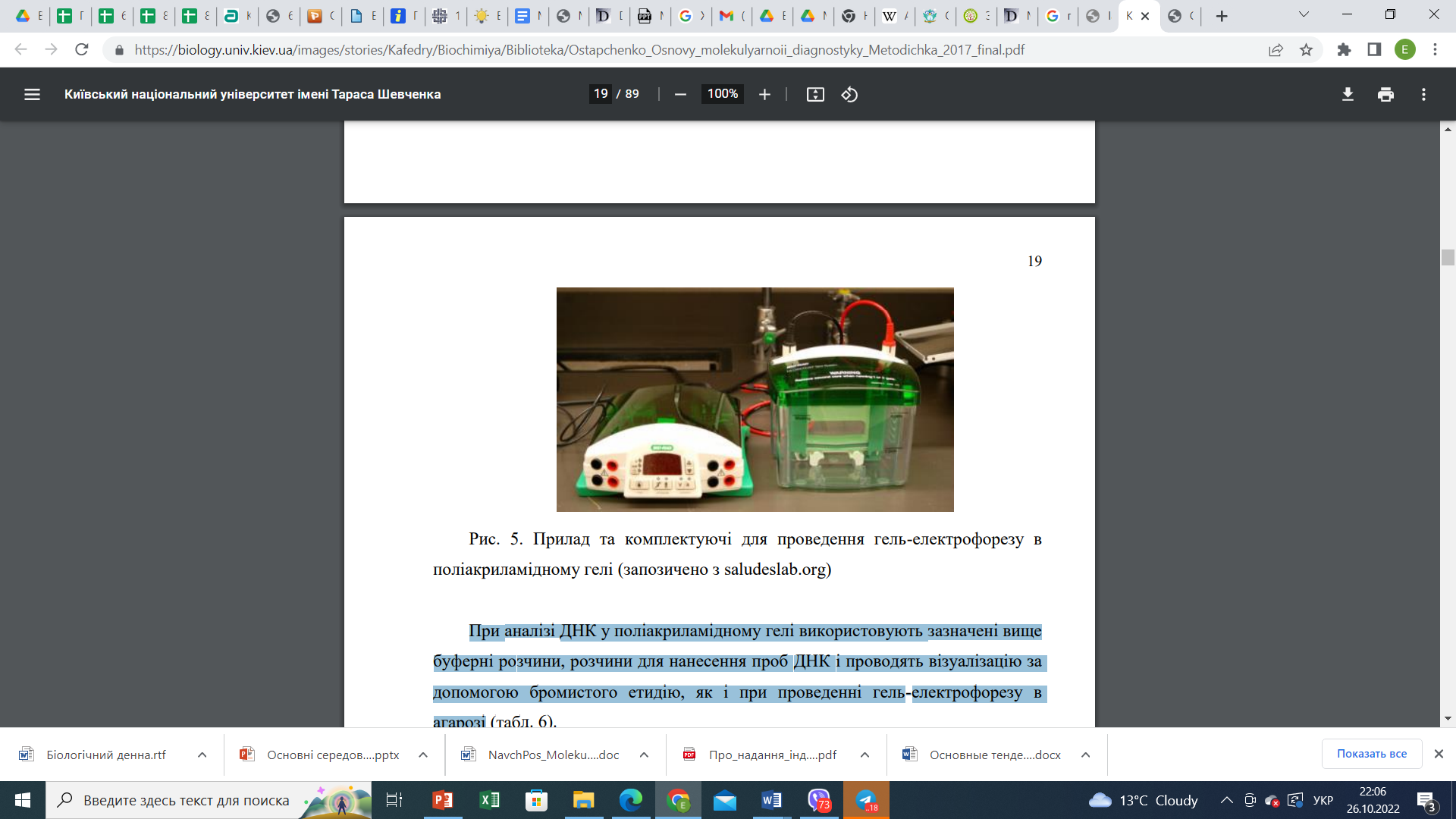
**Вертикальний електрофорез у поліакріламідному гелі**

Поліакриламідні гелі використовують для аналізу і виділення фрагментів ДНК, довжиною **менше ніж 100 п.н**. [Maniatis et al, 1975]. (Також практично всі електрофоретичні аналізи білків та пептидів проводять у поліакриламідному гелі (ПААГ)). Цей гель складається з двох мономерних компонентів:

1. акриламіду - CH2=CH-CONH2 ,

2. NN'-метиленбісакриламіду - (СН2=CH-CONH)2-CH2.

Акриламід – високотоксична речовина, працювати з ним потрібно в рукавичках та захисній масці. Акриламід під дією ініціаторів полімеризації (наприклад, персульфат натрію та ТЕМЕД) утворює лінійні полімери, а NN'- метіленбісакриламід використовується для «зшивання» лінійних полімерів акриламіду. Застосування цього матеріалу дозволило отримувати більш контрольовані, ніж у гелі з інших матеріалів, розміри пор. Склад буферних розчинів, які використовуються для електрофорезу білків не впливає на процес полімеризації акриламіду. Природа, концентрація і рН буферного розчину визначаються особливостями самого процесу електрофорезу. Полімеризації ПААГ не заважає також присутність сечовини (навіть у високих концентраціях), гуанідинхлоріду, формаміду, сахарози або інших детергентів, як ДСН (додецилсульфат натрію), Тритон Х-100, цетавлон. Сахароза навіть сприяє полімеризації і покращує механічні властивості гелю. Розміри пор варіюють концентрацією метиленбісакріламіду. Зазвичай використовують 3,5 - 20 % ПААГ.

Співвідношення між кількістю агента, який зшиває, і акриламідом дуже важливе, оскільки воно істотно впливає на механічні та фізичні властивості гелю. Було встановлено, що чим вища концентрація акриламіду, тим нижчою повинна бути концентрація бісакриламіду, і навпаки. Одночасне збільшення вмісту обох компонентів призводить до утворення гелів із підвищеною жорсткістю і крихкістю, а одночасне зниження – до зростання м'якості й еластичності. Поліакриламідні гелі заливають між двома скляними пластинками. При цьому основна частина поліакриламіду не контактує з повітрям, і полімеризація пригнічується лише у вузькому шарі по краях геля. Розділення в поліакриламідних гелях проводять **лише вертикально**.

При аналізі ДНК у поліакриламідному гелі використовують зазначені вище буферні розчини, розчини для нанесення проб ДНК і проводять візуалізацію за допомогою бромистого етидію, як і при проведенні гель-електрофорезу в агарозі.

Контрольні запитання:

1. Основні принципи електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот.
2. Електрофорезні буфери: основні компоненти, застосування.
3. Поліакріламідні та агарозні гелі: склад, відмінності, переваги і недоліки, галузі застосування.
4. Назвіть та охарактеризуйте 5 головних параметрів, які впливають на швидкість міграції нуклеїнових кислот в агарозному гелі.
5. Поясніть призначення складових буферних розчинів для нанесення проб нуклеїнових кислот і буферних розчинів для проведення горизонтального і вертикального електрофорезу.
6. Барвники для візуалізації нуклеїнових кислот в агарозних та поліакриламідних гелях.