

Ηλεκτροφορητικές Μέθοδοι Διαχωρισμού

Πηκτώματα
αγαρόζης / ακρυλαμιδίου

Ηλεκτροφόρηση

Μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης μορίων

DNA, RNA και **πρωτεϊνών**

σύμφωνα με το **μέγεθος** και το **φορτίο** τους

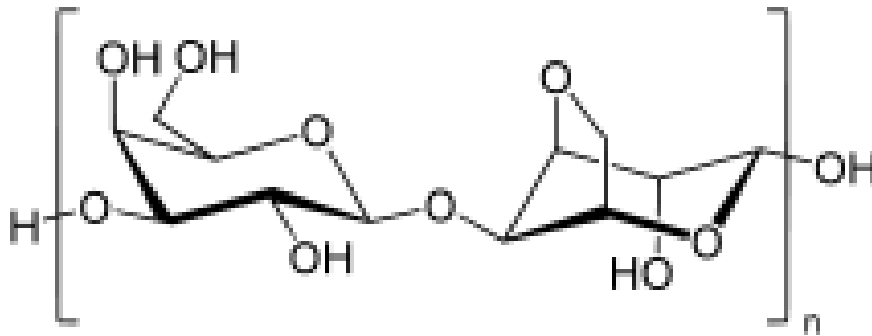
Η ιδέα να χρησιμοποιηθεί ηλεκτροφόρηση για την ανάλυση του DNA ήρθε από τον **Vin Thorne**, ένα βιοχημικό/ιολόγο, που τη **δεκαετία του '60** δούλεψε σε ένα εργαστήριο στη Γλασκώβη !

Υλικό ηλεκτροφόρησης

- ✓ Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ή μικρών μορίων (DNA, RNA, ολιγονουκλεοτίδια) χρησιμοποιείται **πηκτή ακρυλαμίδης**
- ✓ Για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων νουκλεϊνικών οξέων (περισσότερο των 100bp) χρησιμοποιείται **πηκτή αγαρόζης**
- ✓ Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών χρησιμοποιείται επίσης η **πηκτή αμύλου** (μερικώς υδρολυμένο άμυλο πατάτας σε ποσοστό 5-10%)

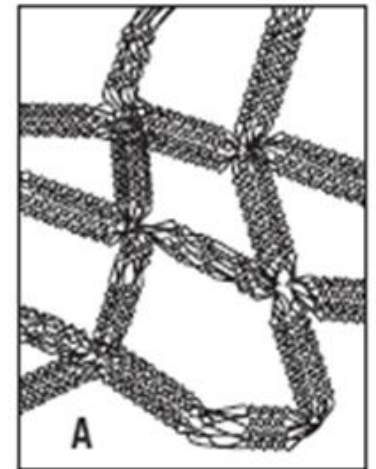
Αγαρόζη

- Το άγαρ απομονώνεται από φύκη (red algae) και αποτελείται από αγαρόζη και αγαροπηκτίνη
- Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές (D-galactose και L-galactopyranose)



Πηκτή Αγαρόζης

- ✓ Το ουδέτερο φορτίο καθώς και η χαμηλού βαθμού χημική πολυπλοκότητα της αγαρόζης την κάνουν ένα πολύ καλό υλικό που δεν αλληλεπιδρά με τα βιομόρια.
- ✓ Η πηκτή από καθαρή αγαρόζη έχει σχετικά μεγάλους πόρους που επιτρέπει το διαχωρισμό μεγάλων μορίων
- ✓ Διαχωρισμός DNA (5-20000bp), RNA και πρωτεϊνών >200kD



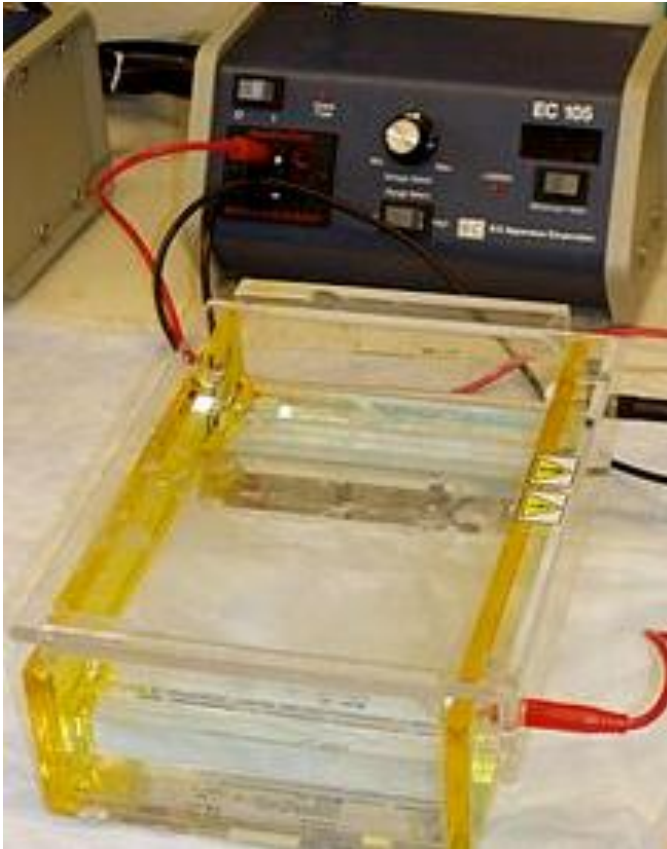
Φτιάχνοντας πηκτή αγαρόζης



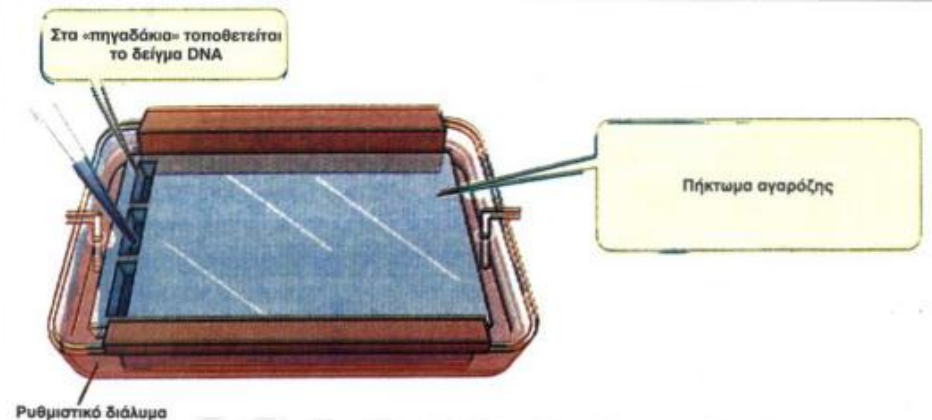
- ✓ Η πηκτή αγαρόζης είναι συνήθως από 0.7% (καλός διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA 5–10kb) μέχρι 2% (καλός διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA 0.2–1kb) περιεκτικότητα σε αγαρόζη

Πολύ μεγάλα μόρια DNA (αλλά όχι και μεγαλύτερα από 750kb) μπορούν να αναλυθούν σε πηκτή αγαρόζης 0.1-0.2% για πολλές μέρες !

Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA

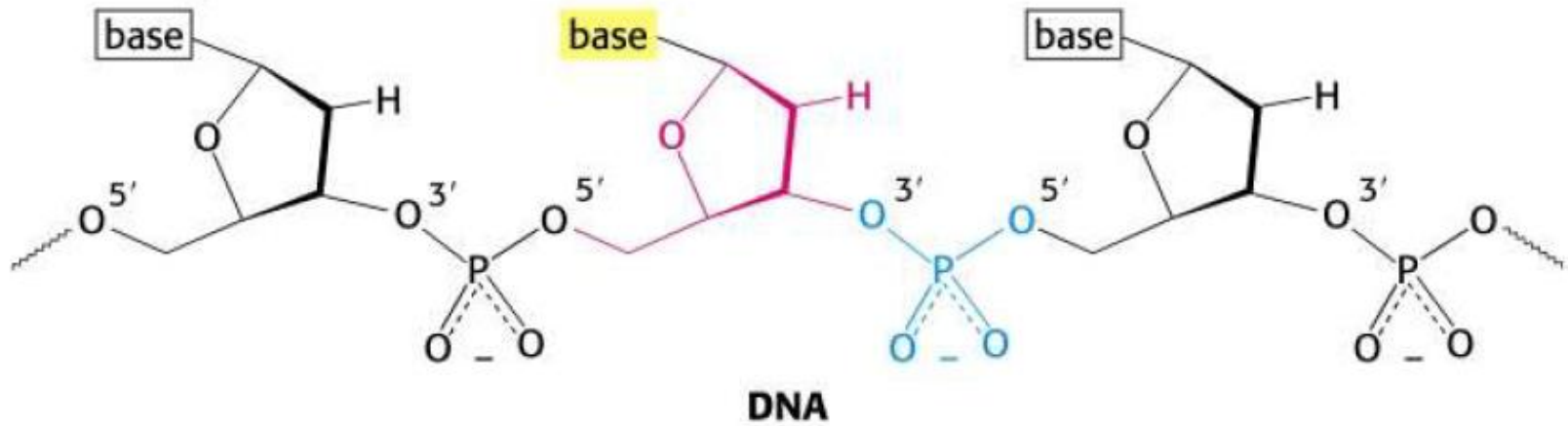


- ✓ Τα νουκλεϊνικά οξέα διαχωρίζονται μέσα σε μια πηκτή αγαρόζης εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο
- ✓ Τα μικρότερα μόρια κινούνται περισσότερο γιατί διαπερνούν πιο εύκολα από τους πόρους της πηκτής



Η πρώτη μοντέρνα συσκευή ηλεκτροφόρησης σχεδιάστηκε από τον **Walter Schaffner**, το **1975**, που τότε ήταν απόφοιτος φοιτητής στη Ζυρίχη ! Ως τότε το κάθε δείγμα DNA αναλυόταν ξεχωριστά σε μικρά, κυλινδρικά και κατακόρυφα gels !

Διαχωρισμός σε πηκτή αγαρόζης



✓ Τα νουκλεϊκά οξέα, **μετακινούνται από αρνητικά προς θετικά ηλεκτρόδια**, λόγω στο φυσικά-φερόμενο **αρνητικό τους φορτίο** που παρατηρείται στο σκελετό σακχάρου-φωσφορικής ομάδας

Προετοιμασία δειγμάτων



Διάλυμα φόρτωσης: περιέχει μια ουσία υψηλής πυκνότητας (όπως γλυκερόλη) και 1 ή 2 χρωστικές που μετακινούνται με ταχύτητα περίπου ίδια με του DNA (μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανό του ξυλενίου)

Ρυθμιστικά Διαλύματα

- Χρησιμοποιούνται για να παρέχουν τα απαραίτητα ιόντα για να πραγματοποιείται **μεταφορά ρεύματος** και να **διατηρούν το pH** σε μια σχετικά σταθερή τιμή
- Τα πιο κοινά διαλύματα είναι

TAE (Tris/Acetate/EDTA) (μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα, θέλει χαμηλότερη τάση και περισσότερο χρόνο αλλά καλύτερα αποτελέσματα, καλό διαχωρισμό σε DNA >4kb και σε υπερελικωμένο DNA)

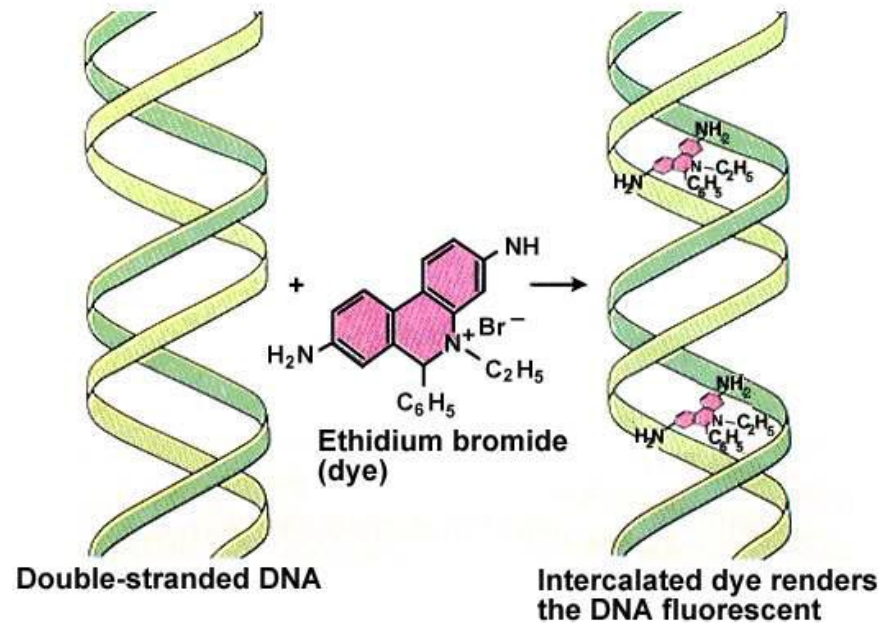
TBE (Tris/Borate/EDTA) (προβληματικό με το RNA λόγω αλληλεπίδρασης, καλό διαχωρισμό σε DNA 0.1-3 kb και όταν εφαρμόζουμε τάση >150V)

Παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό μετακίνησης του DNA στην πηκτή

- Το μέγεθος του DNA
- Η συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη
- Η διαμόρφωση του DNA (κυκλικό υπερ-ελικωμένο, κυκλικό ανοιχτό/κομμένο, γραμμικό)
- Η τάση του ηλεκτρικού ρεύματος
- Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (σύνθεση και ιοντική ισχύς)
- Ο τύπος της αγαρόζης (standard, low-melting-temperature)

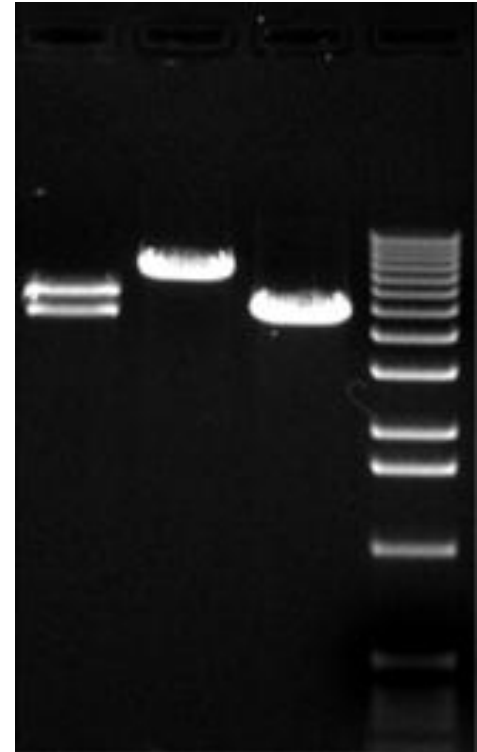
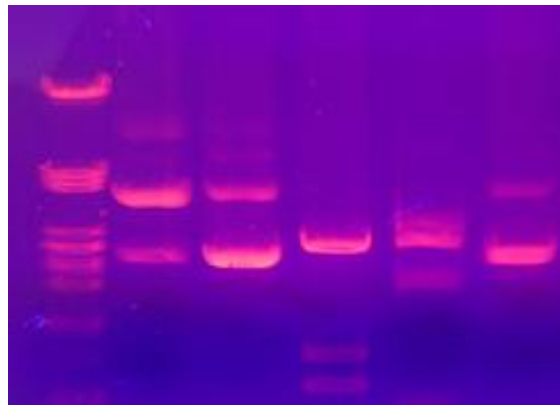
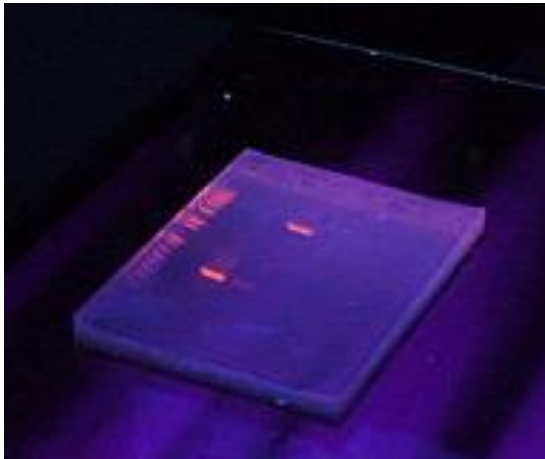
Απεικόνιση αποτελεσμάτων

- Το DNA μπορεί να γίνει ορατό με τη χρήση **Βρωμιούχου Αιθιδίου (EtBr)**
- Το βρωμιούχο αιθίδιο όταν παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή στο RNA) μπορεί να φθορίζει στο υπεριώδες φως
- Υπολογίζεται ότι ένα μόριο EtBr παρεμβάλλεται κάθε 2,5 νουκλεοτίδια
- Σχηματίζονται δεσμοί van der Waals
- Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου EtBr



Άλλες επιλογές...
Gelred
Syber Green
SYBR Gold

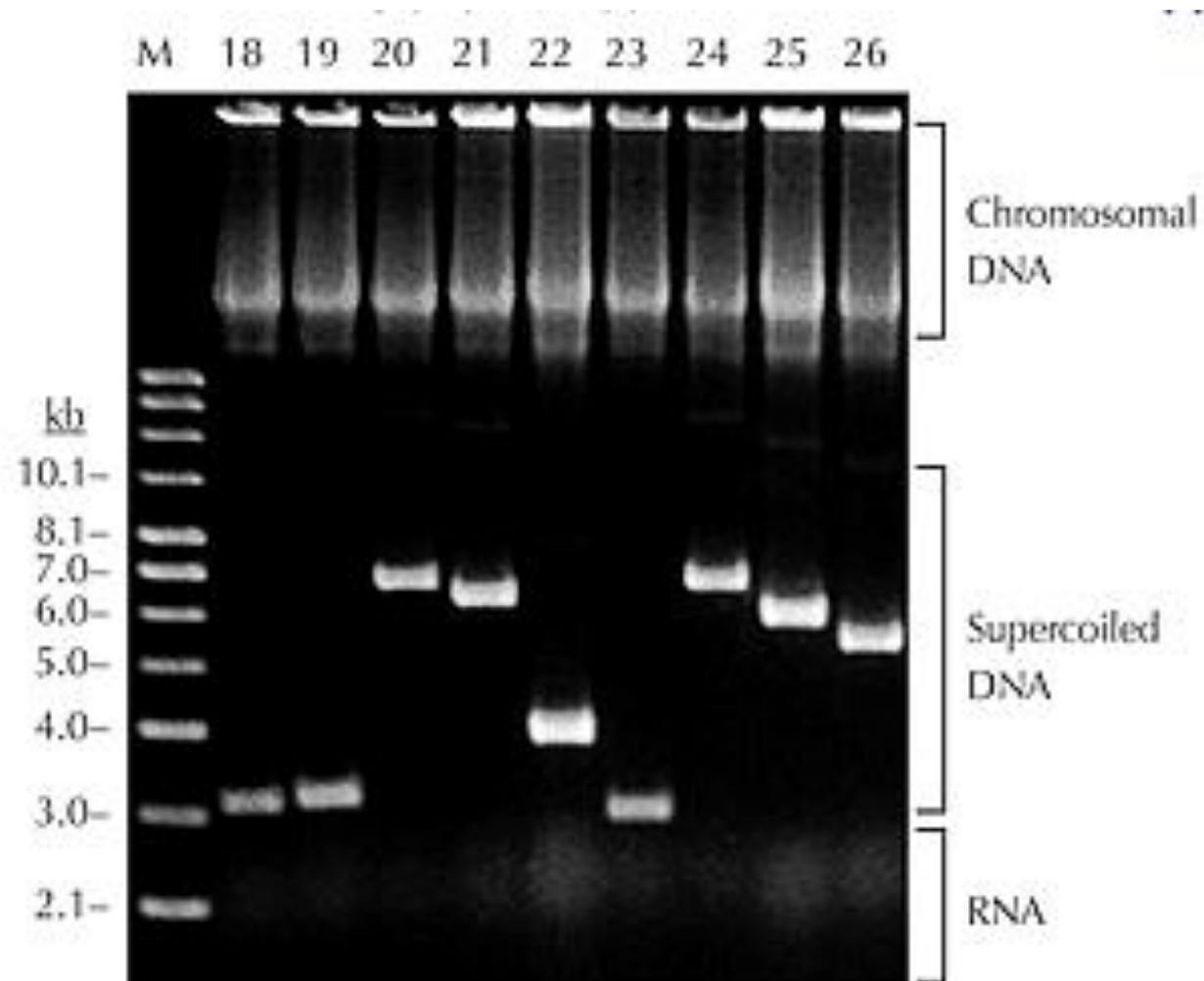
Απεικόνιση αποτελεσμάτων



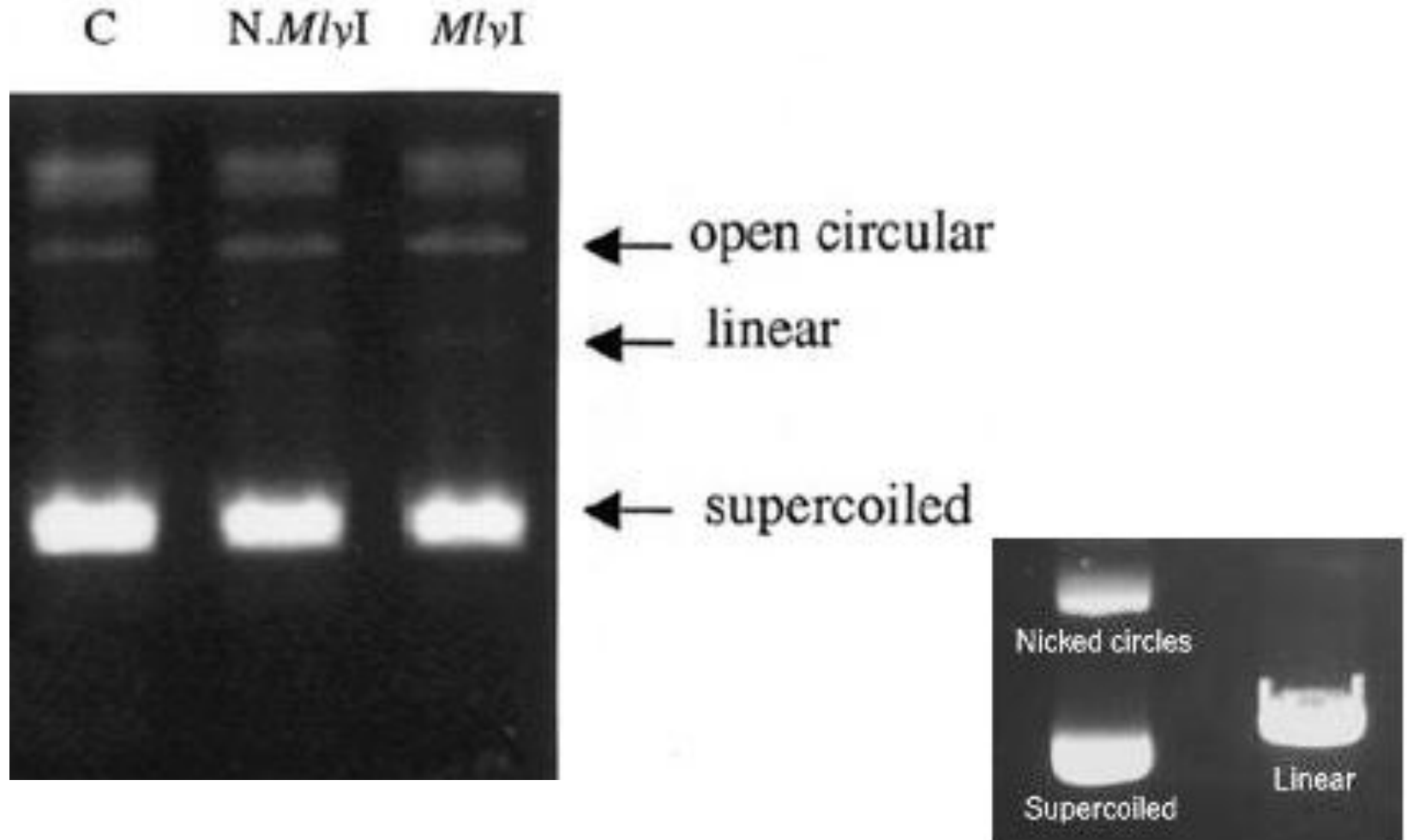
φωτογραφία

Ζώνες που περιέχουν ακόμη και μόνο 20pg DNA μπορούν να ανιχνευτούν (με SYBR Gold) με απευθείας εξέταση της πηκτής κάτω από λάμπα UV ! Με EtBr γίνονται ορατές ζώνες μέχρι και 10ng !

Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης



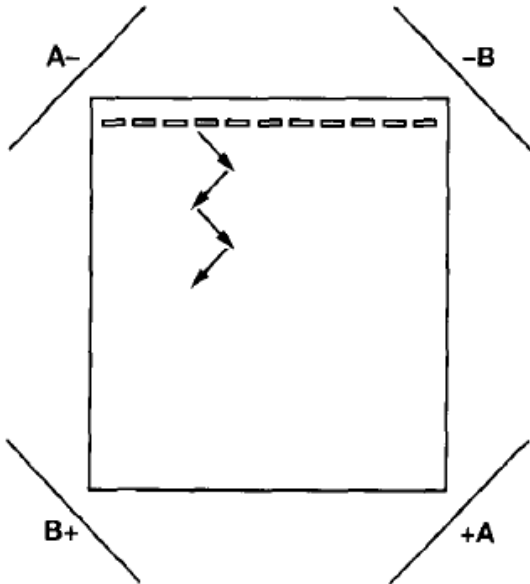
Ανάλυση πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης



Ηλεκτροφόρηση παλμικού πεδίου

Pulsed field gel electrophoresis

Διαχωρισμός μεγάλων μορίων DNA από περίπου 20kb μέχρι και 5Mb !

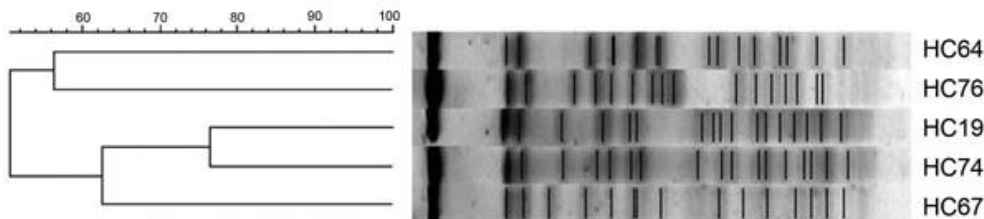


Πρόβλημα

Μεγάλα κομμάτια DNA (30kb και πάνω) δε μπορούν να διαχωριστούν σε κλασική ηλεκτροφόρηση, τρέχουν όλα ταυτόχρονα και τελικά βλέπουμε μια μεγάλη ζώνη

Λύση

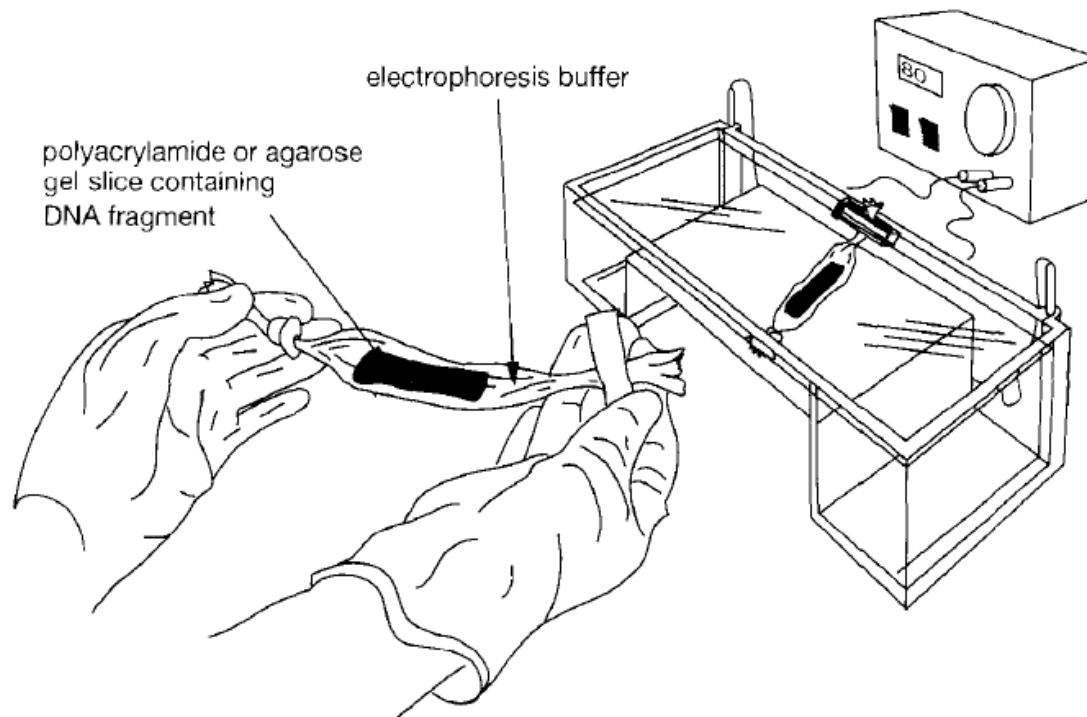
Εφαρμόζονται 2 ηλεκτρικά πεδία, εναλλάξ, σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Τα μεγαλύτερα κομμάτια χρειάζονται περισσότερο χρόνο να αλλάξουν κατεύθυνση, οπότε καθυστερούν και διαχωρίζονται από τα μικρότερα.



π.χ. Ανάλυση διαφορετικών στελεχών *E. coli*

Ανάκτηση DNA από πηκτή αγαρόζης ή ακρυλαμίδης «Ηλεκτροέκλυση»

Recovery of DNA from Agarose and Polyacrylamide Gels: Electroelution into Dialysis Bags

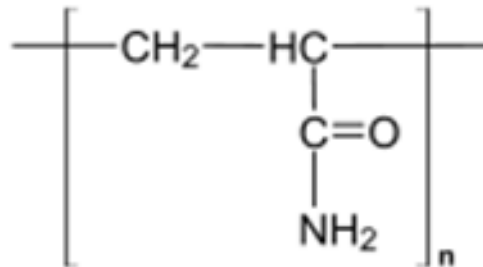


Σήμερα για ανάκτηση DNA χρησιμοποιούνται ειδικές κολονίτσες με φίλτρα που πωλούνται από εταιρίες (σε kit) !

Η μέθοδος χρησιμοποιείται επίσης για ανάκτηση πρωτεϊνών από πηκτή ακρυλαμίδης !

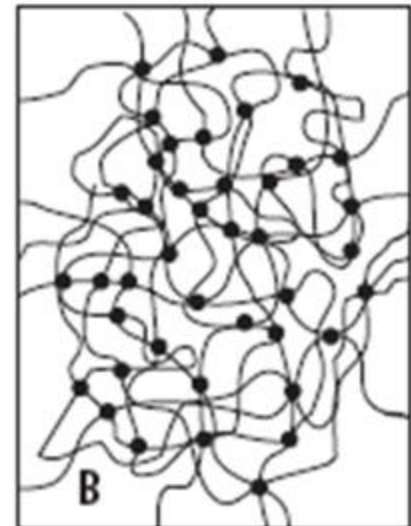
Πολυακρυλαμίδη

Πολυμερές που αποτελείται από υπομονάδες ακρυλαμίδης



ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

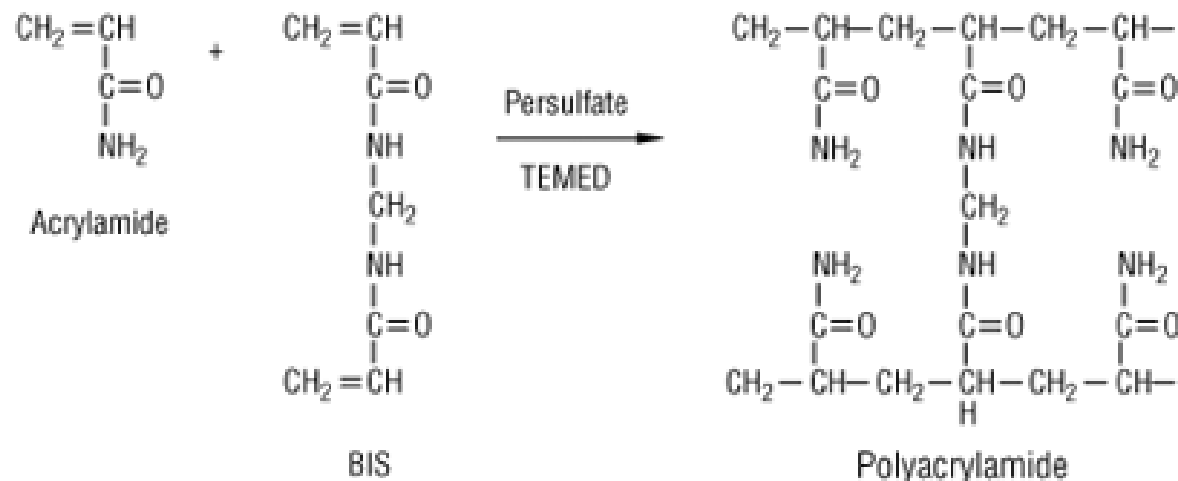
- Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγέθους 5 ως 2000kDa
- Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA 5-500bp



Πολυμερισμός ακρυλαμίδης

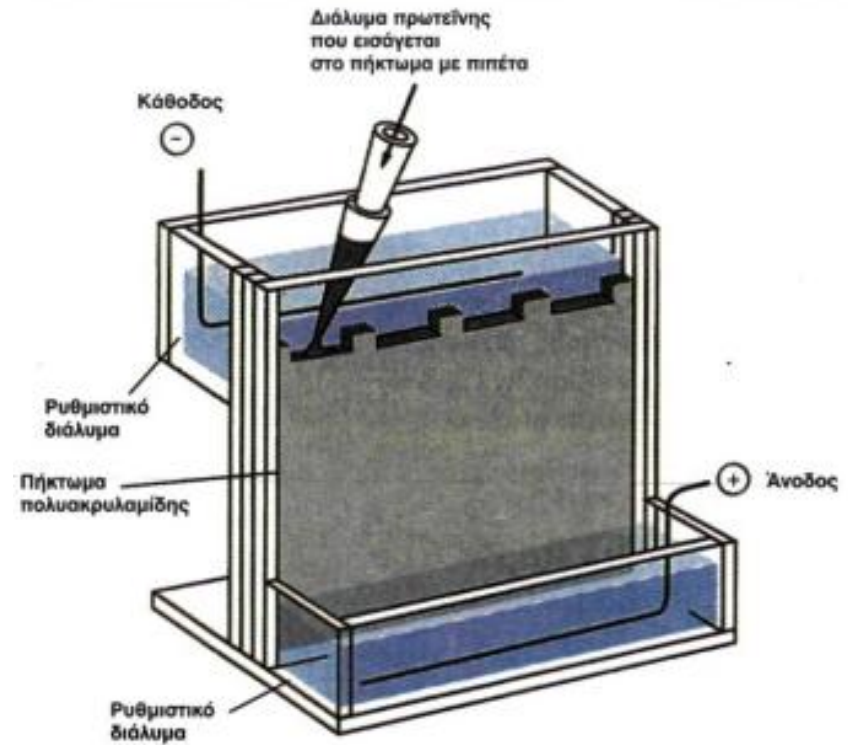
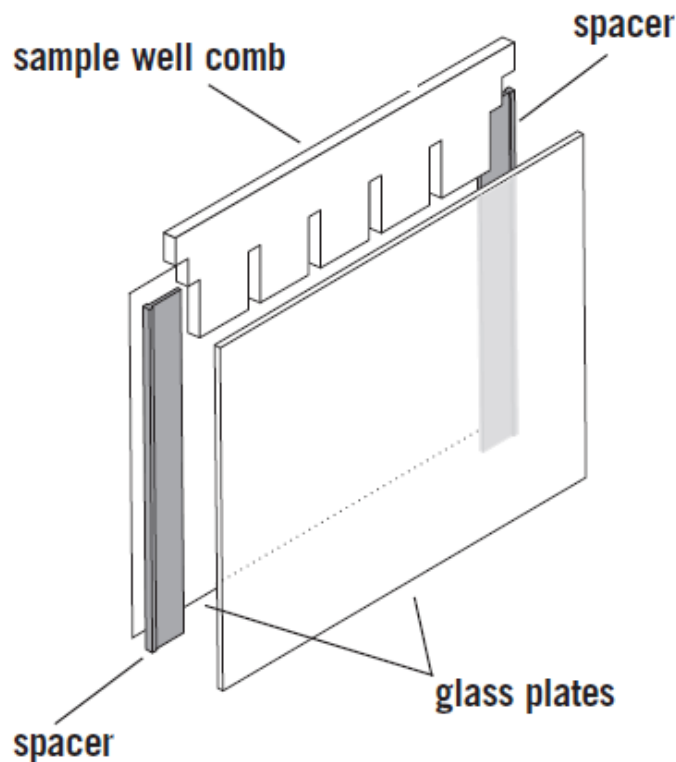
➤ Στην πηκτή πολυακρυλαμίδης η ακρυλαμίδα συνδέεται σταυρωτά (cross-linked) με ***N,N'*-Methylenebisacrylamide**

Η δις-ακρυλαμίδα πολυμερίζεται με την ακρυλαμίδα σχηματίζοντας διασυνδέσεις μεταξύ των αλυσίδων ακρυλαμίδης σχηματίζοντας ένα **δίκτυο πολυακρυλαμίδης**



APS (ammonium persulfate): παράγοντας πολυμερισμού: οξειδωτικός παράγοντας και πηγή ριζών
TEMED (*N,N,N,N'*-tetramethylethylenediamine): καταλύει τον πολυμερισμό ενισχύοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών από το APS

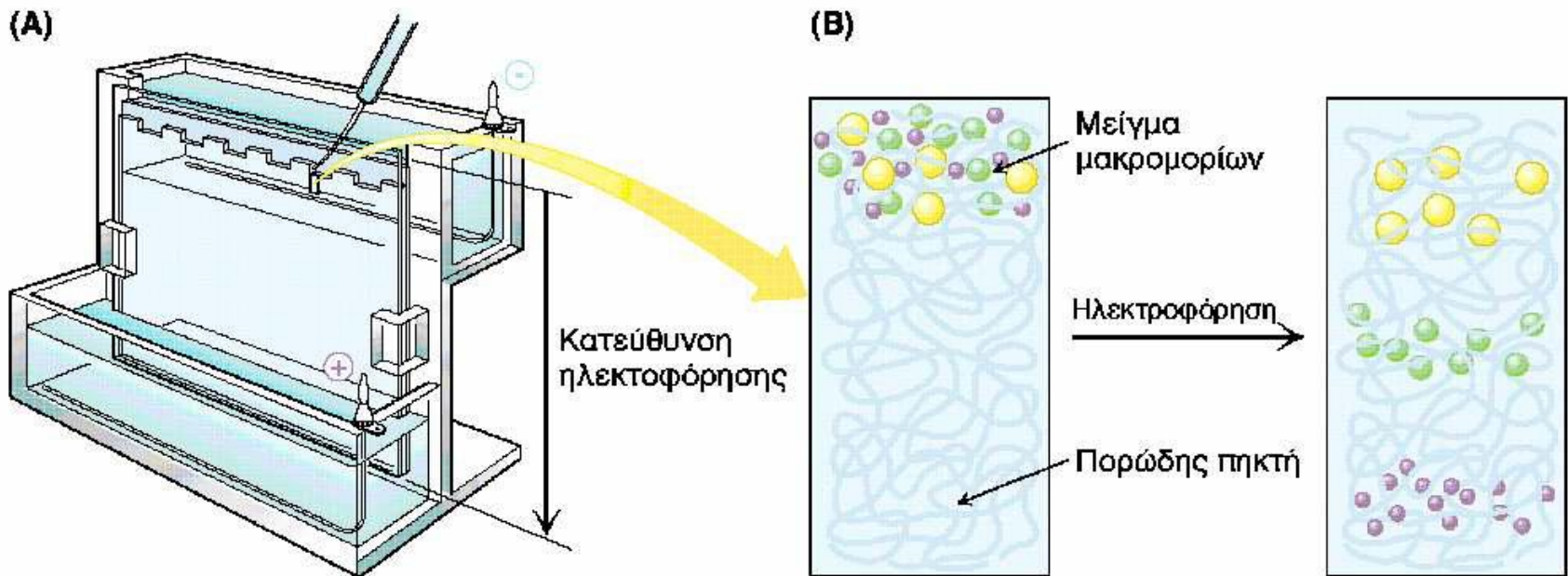
Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών



✓ Οι πρωτεΐνες συνήθως αποδιατάσσονται με απορρυπαντικά, όπως το sodium dodecyl sulfate (SDS) που τους προσδίδει ένα αρνητικό φορτίο, οπότε κινούνται μέσω της πηκτής προς την άνοδο

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

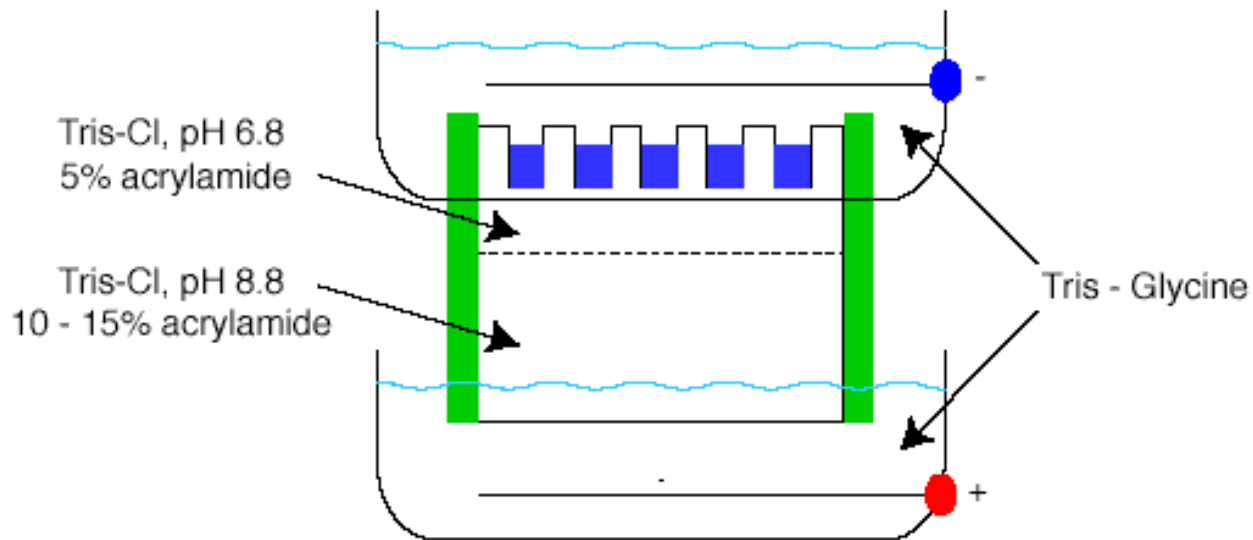
SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)



✓ Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, οι μικρότερες μετακινούνται ταχύτερα

SDS-PAGE

Διαχωρισμός πρωτεϊνών ασυνεχούς πηκτής



Πηκτή συμπύκνωσης (stacking gel): 4%-5% ακρυλαμίδιο. Έχει μεγάλο μέγεθος πόρων και συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή (ανάμεσα στα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος, Cl και γλυκίνη)

Πηκτή διαχωρισμού (separating gel): 6%, 8%, 10%, 12% ή 15% ακρυλαμίδιο.

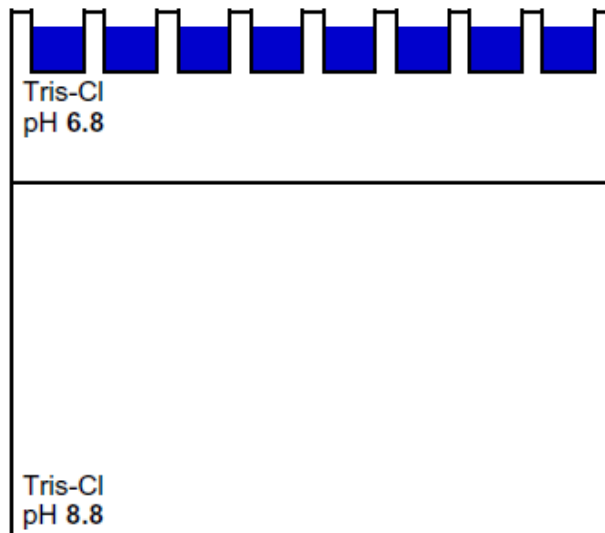
SDS-PAGE

Αποδιατακτικές συνθήκες

Laemmli gel:

Cathode buffer:

25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3



Proteins are denatured by SDS:

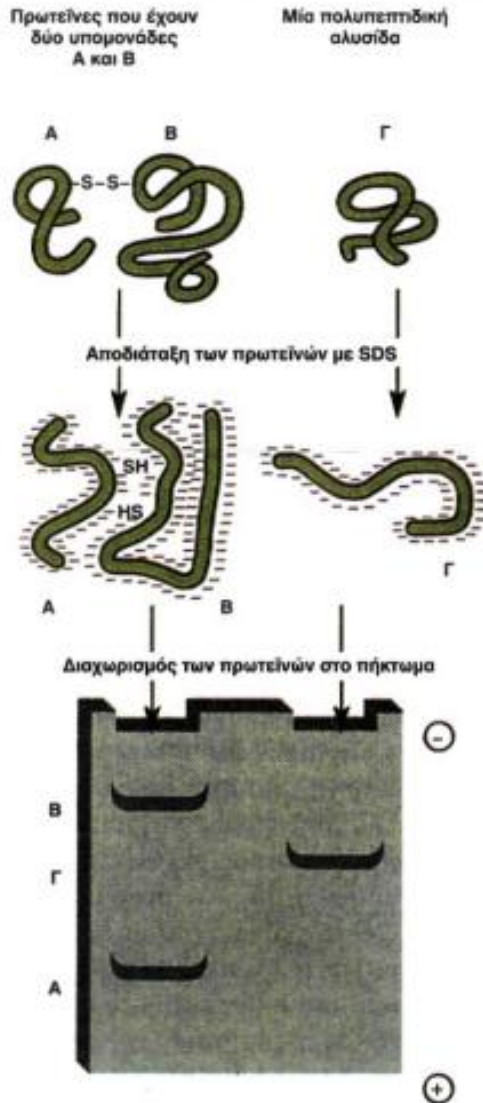
- SDS confers negative charges to the protein at a more or less uniform charge/mass ratio
- separation of the unfolded proteins in the molecular sieve is achieved only by the size of denatured proteins

Anode buffer:

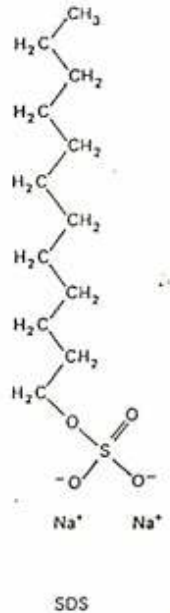
25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3

SDS-PAGE

προετοιμασία δειγμάτων



SDS: καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και αποκτούν μεγάλο αρνητικό φορτίο



Μερκαπτοαιθανόλη:

ανάγει τους
δισουλφιδικούς δεσμούς

Βράσιμο των δειγμάτων στους
95 βαθμούς για 3-5 λεπτά

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Απεικόνιση αποτελεσμάτων

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μπορούν να εμφανιστούν με

χρώση

Coomassie brilliant blue

(ανιχνεύει 10ng και πάνω)



Χρωματισμός: Η χρωστική coomassie προσδένεται σε αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, αλλάζοντας χρώμα από κοκκινωπό-καφέ έως έντονο μπλε

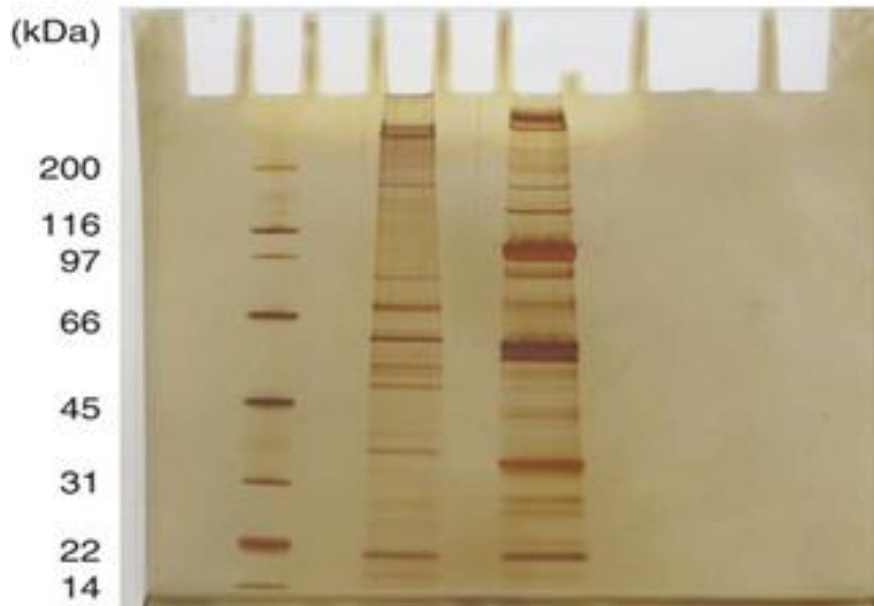
Αποχρωματισμός: πλύση της περίσσειας χρωστικής

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Απεικόνιση αποτελεσμάτων

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μπορούν να εμφανιστούν με

χρώση αργύρου Ag
(ανιχνεύει 0.5ng και πάνω)



Εναποθέτει μεταλλικό άργυρο στην επιφάνεια της πηκτής στα σημεία που βρίσκονται οι πρωτεΐνες

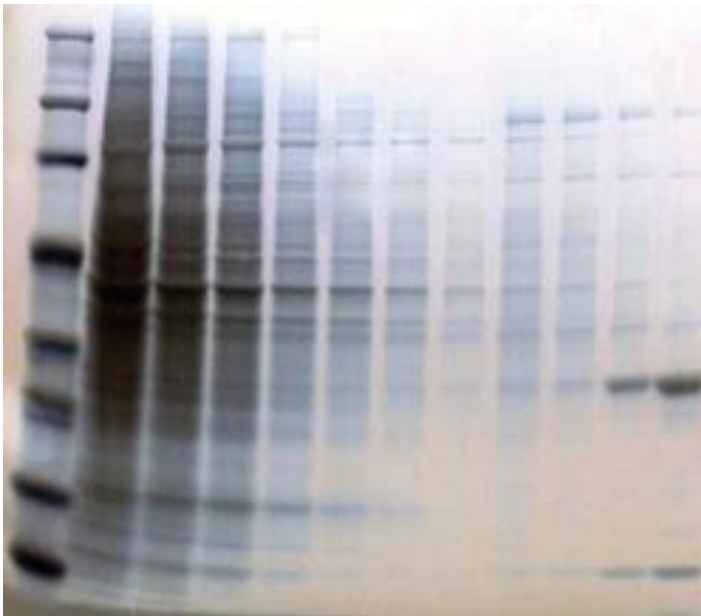
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Απεικόνιση αποτελεσμάτων

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μπορούν να εμφανιστούν με

Αρνητική ή αντίστροφη χρώση

(ανιχνεύει και λιγότερο από 1 ng)



Σχηματίζονται αδιάλυτα μεταλλικά άλατα στην πηκτή γύρω από τις πρωτεΐνες ενώ οι πρωτεΐνες μένουν αχρωμάτιστες.

Τα μεταλλικά άλατα εναποτίθενται στο γύρω υλικό μόνο.

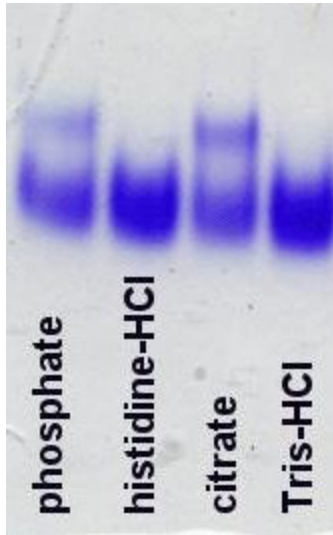
Συνήθως χρησιμοποιούνται άλατα ψευδαργύρου μαζί με ιμιδαζόλιο.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε φυσική κατάσταση (Native PAGE)

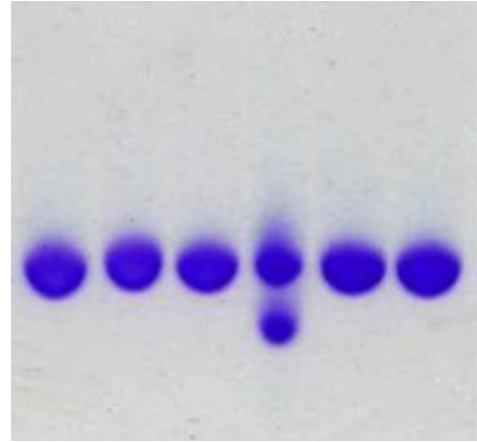
- **Μη-αποδιατακτικές συνθήκες**, οι πρωτεΐνες έχουν την τριτοταγή τους διαμόρφωση
- Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών οφείλεται στο εσωτερικό τους φορτίο, στο μέγεθος και το σχήμα τους
- Η μετακίνηση στην πηκτή συμβαίνει γιατί οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν αρνητικό φορτίο σε αλκαλικά διαλύματα (η κατεύθυνση της πρωτεΐνης μπορεί να αλλάξει χρησιμοποιώντας όξινο, ουδέτερο ή αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα)
- ☑ Κάποιες πρωτεΐνες διατηρούν τη λειτουργικότητά τους
- ✗ Η εύρεση του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος είναι δύσκολη και συνήθως χρειάζονται δοκιμές

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

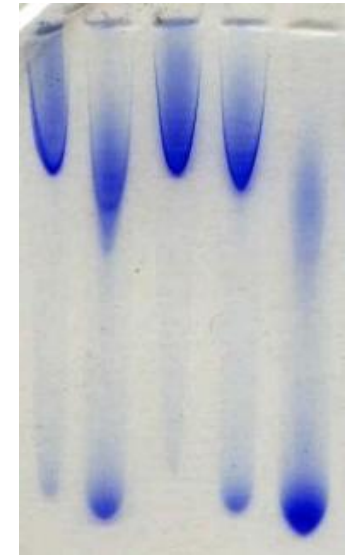
Native PAGE- παραδείγματα



Αυτή η όξινη πρωτεΐνη σχηματίζει διμερή όταν χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλλά όχι σε Tris-Cl.



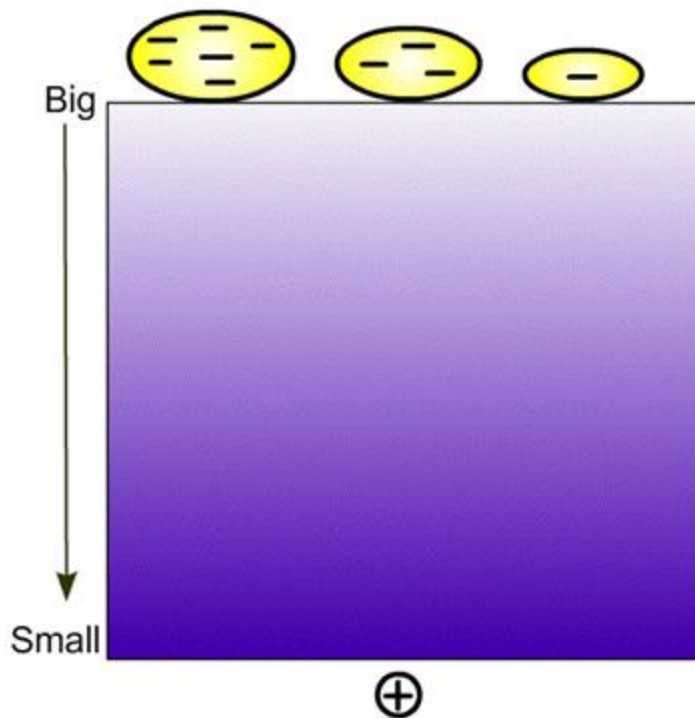
Η ίδια πρωτεΐνη έχει υποστεί 6 διαφορετικές επεξεργασίες. Στην 4^η υπάρχει ένα προϊόν χημικής αποδόμησης. Έτσι βρίσκουμε συνθήκες που μειώνουν την αποδόμηση.



Η ίδια βασική πρωτεΐνη έχει θερμανθεί σε 5 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Στο τελευταίο δεν υπάρχει συσσωμάτωση, τρέχει μόνο ένα μονομερές προϊόν.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα διαβάθμισης

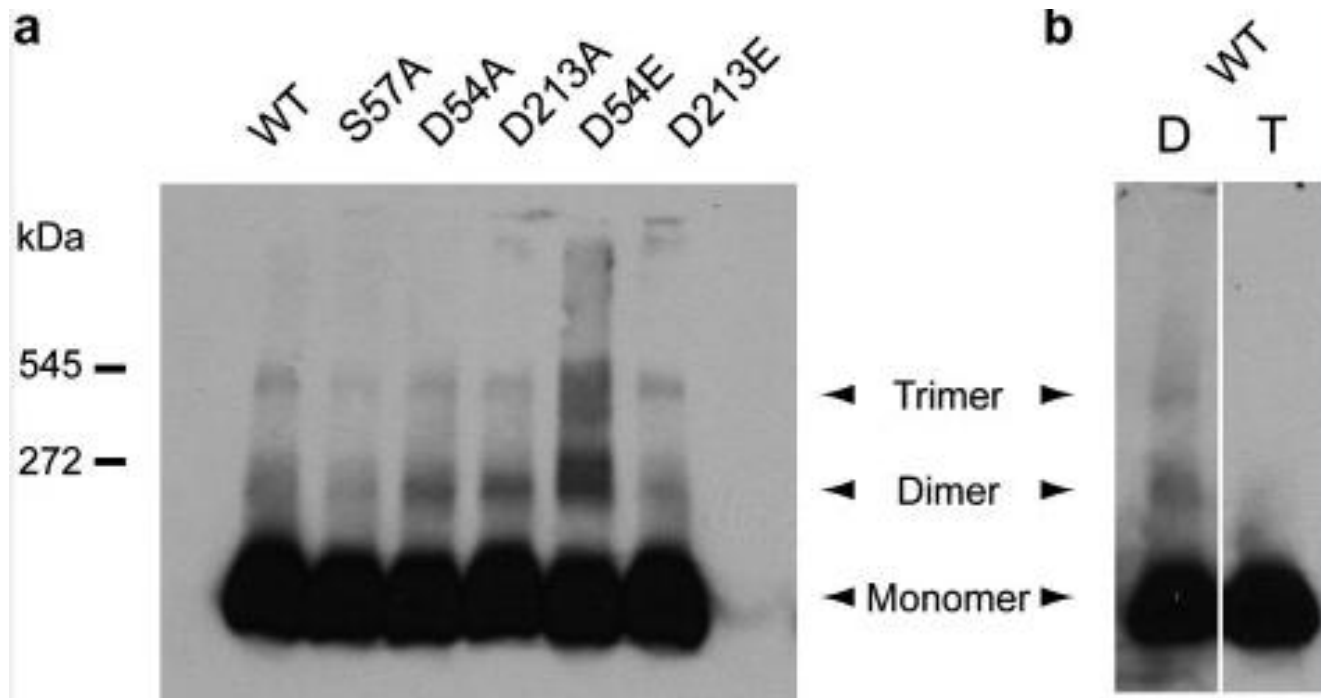
Native gradient PAGE



Separate native proteins by size – proteins stop moving when they reach a certain gel density (but this may take a very long time ...)

A great technique to study protein oligomerization!

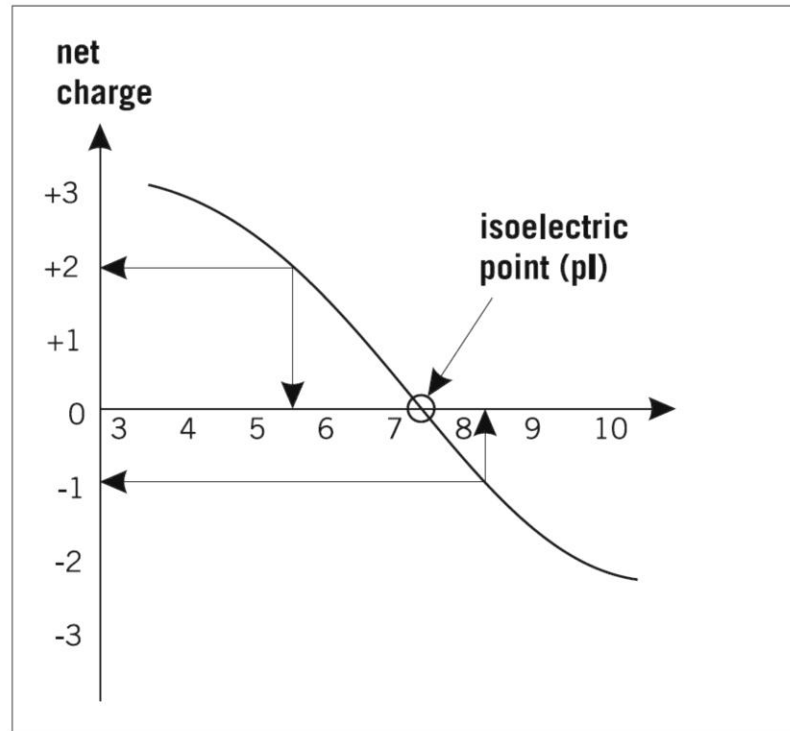
Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα διαβάθμισης

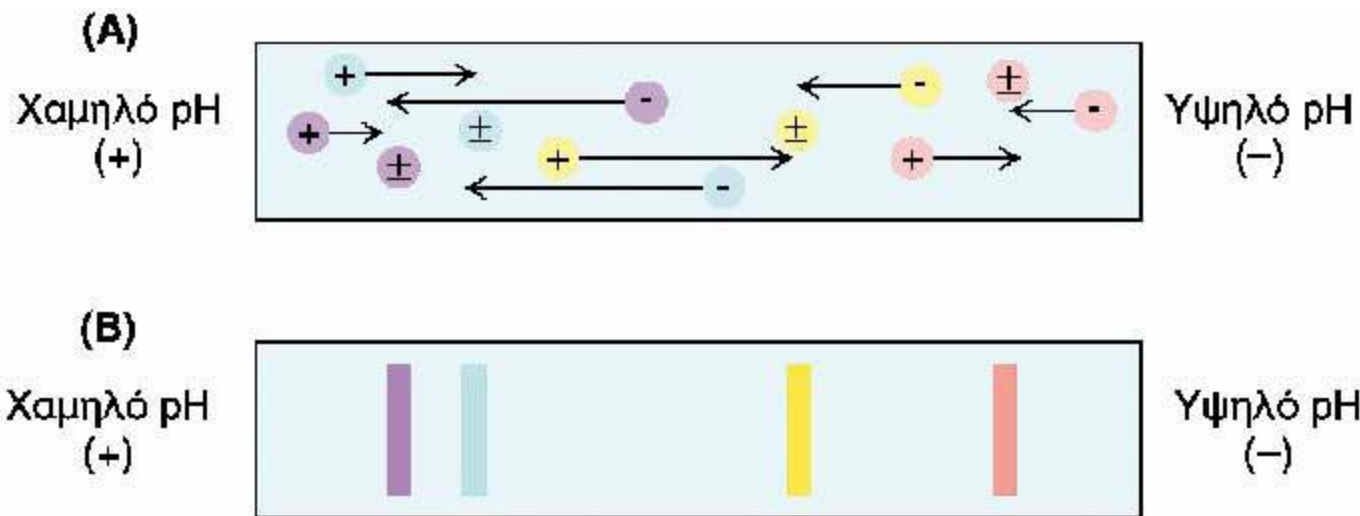


π.χ. πρωτεϊνικά μεμβρανικά σύμπλοκα που
αναλύθηκαν σε φυσικό πήκτωμα διαβάθμισης 4–15%
σε πολυακρυλαμίδα

Ισοηλεκτρικός Εστιασμός (IEF)

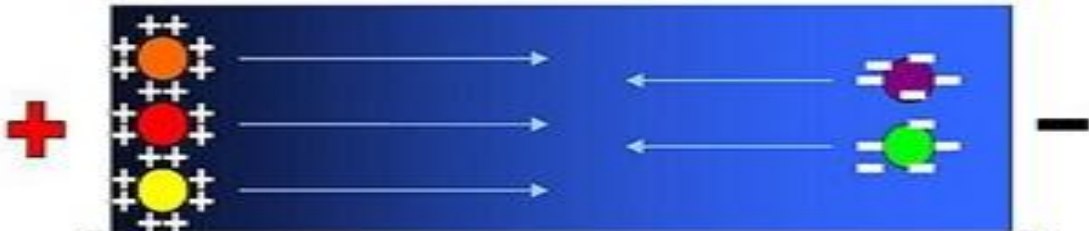
Μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο



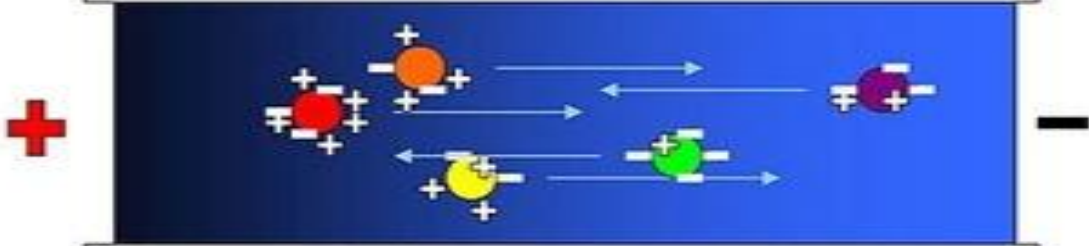


- Δημιουργία στην πηκτή μιας βαθμίδωσης pH με την προσθήκη μίγματος ηλεκτρολυτών (αμφολύτες) στο διάλυμα πολυμερισμού του πήγματος
- Μετά την τοποθέτηση του δείγματος των πρωτεϊνών, το ηλεκτρικό ρεύμα θα οδηγήσει τις πρωτεΐνες στο ισοηλεκτρικό τους σημείο

Stable pH gradient



At low pH, most proteins have a positive charge while at high pH, most proteins have a negative charge.



When an electric field is present, the cathode and anode ends pull the proteins to their isoelectric point where each individual protein possesses a neutral charge.



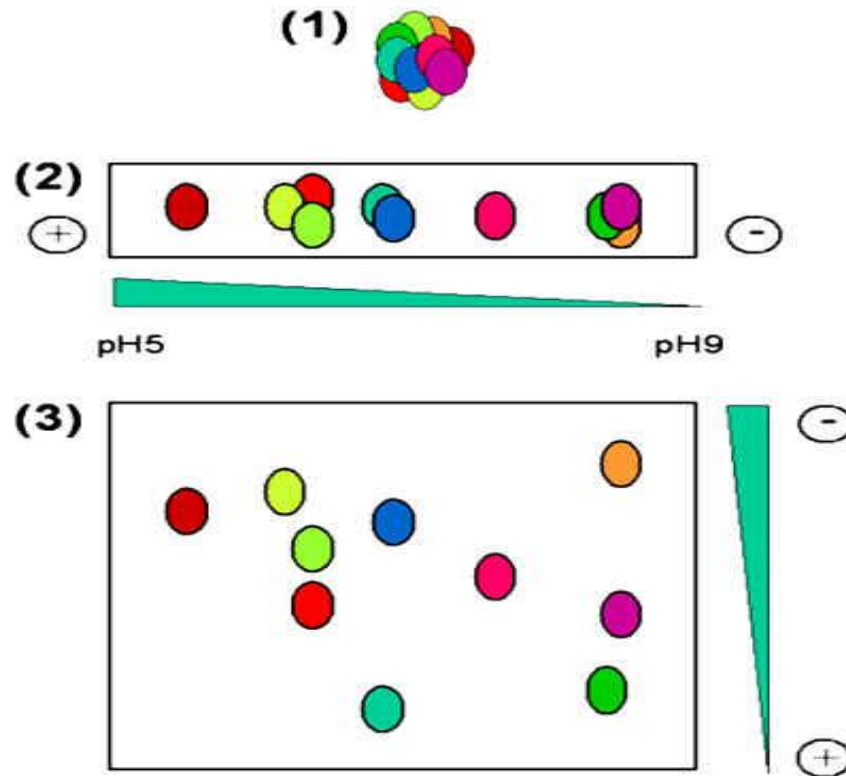
The proteins stopped migrating because they've reached their isoelectric point at a unique pH level.

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟ
ΣΗΜΕΙΟ:
pH στο οποίο το ολικό
φορτίο είναι ουδέτερο

Το ολικό φορτίο της
πρωτεΐνης γίνεται
μηδέν και η πρωτεΐνη
ακινητοποιείται

Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων (2D)

✦ Πρόκειται για συνδυασμό του ισοηλεκτρικού εστιασμού με την ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE



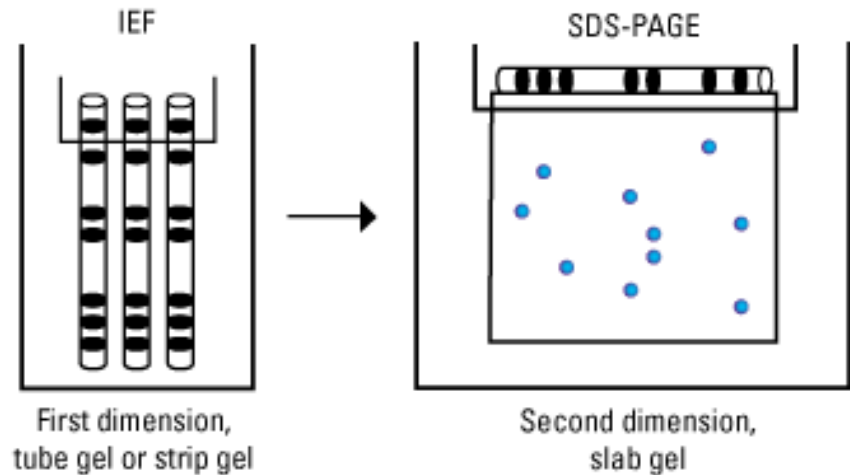
Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων (2D)

1^η Διάσταση: Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ισοηλεκτρικό εστιασμό

Βαθμίδωση pH στο gel

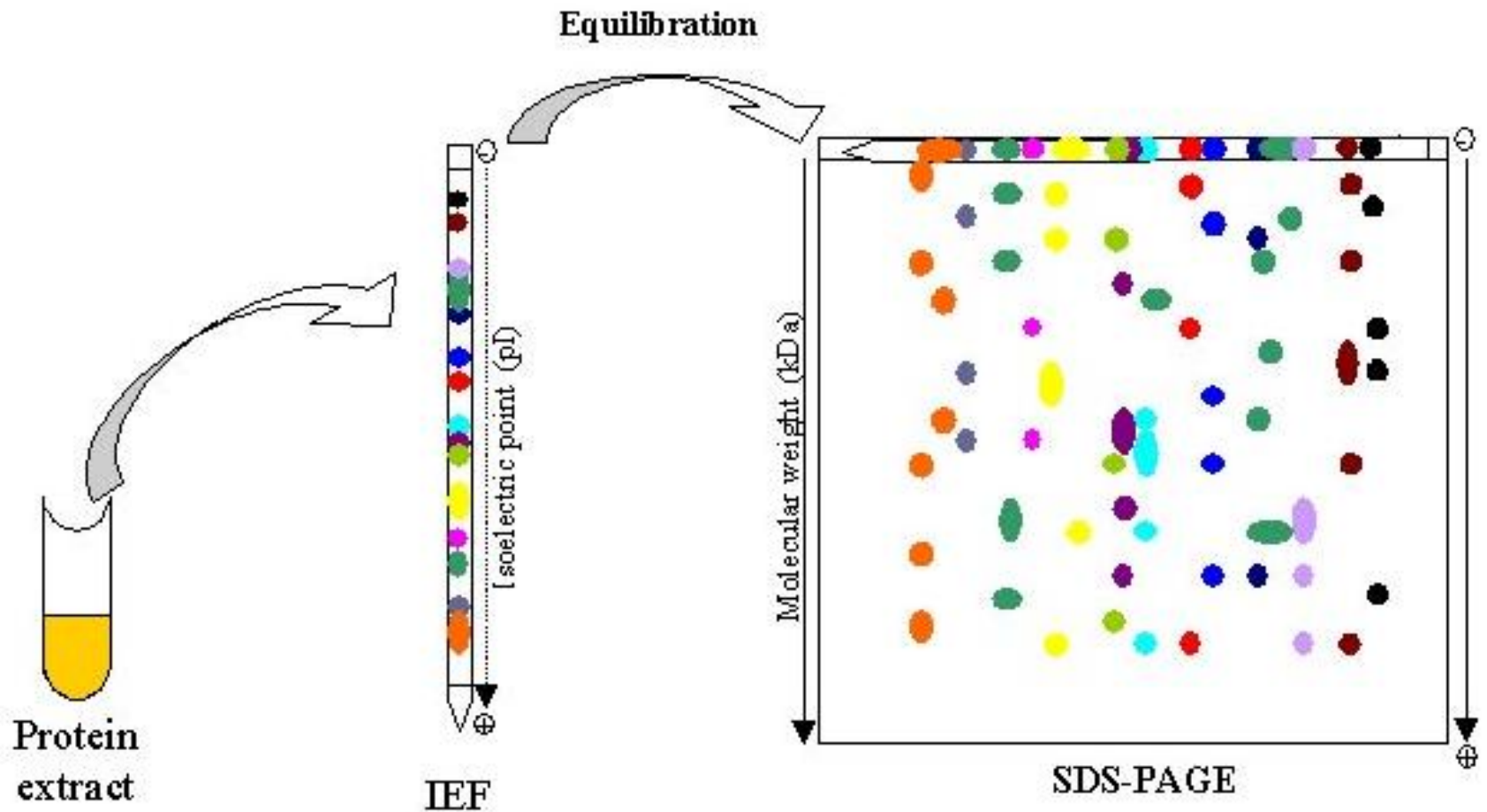
Οι πρωτεΐνες καθλώνονται στο ισοηλεκτρικό τους σημείο

2^η Διάσταση: Σε 90° SDS-PAGE



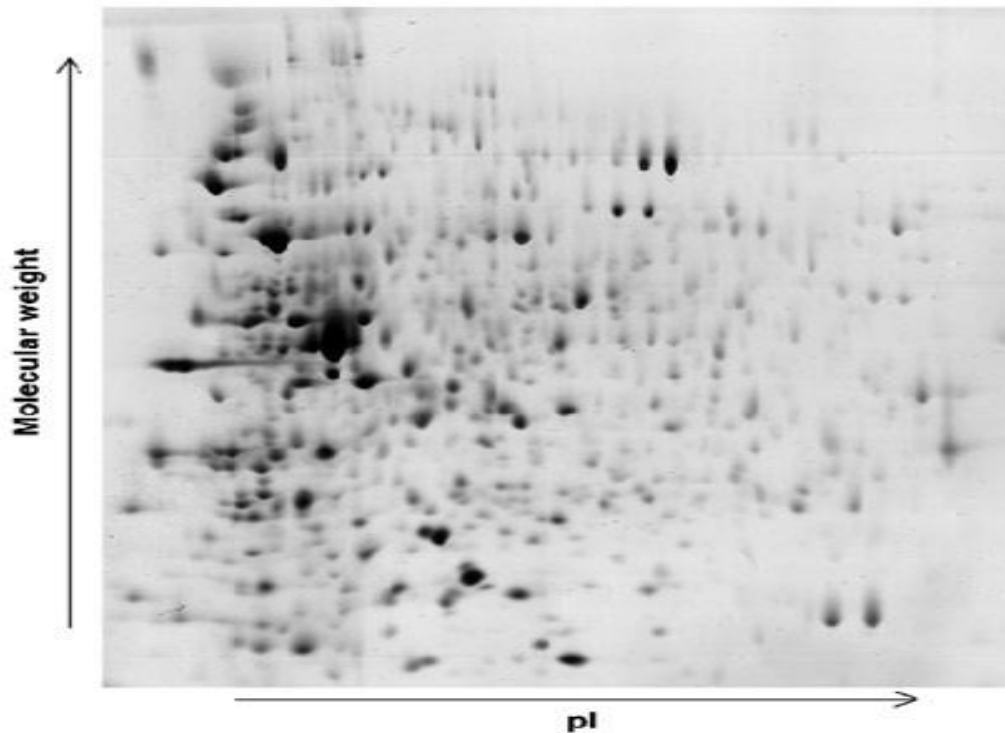
Overview of 2D gel electrophoresis. In the first dimension (left), one or more samples are resolved by isoelectric focusing (IEF) in separate tube or strip gels. IEF is usually performed using precast immobilized pH-gradient (IPG) strips on a specialized horizontal electrophoresis platform. For the second dimension (right), a gel containing the pI-resolved sample is laid across to top of a slab gel so that the sample can then be further resolved by SDS-PAGE.

Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων (2D)

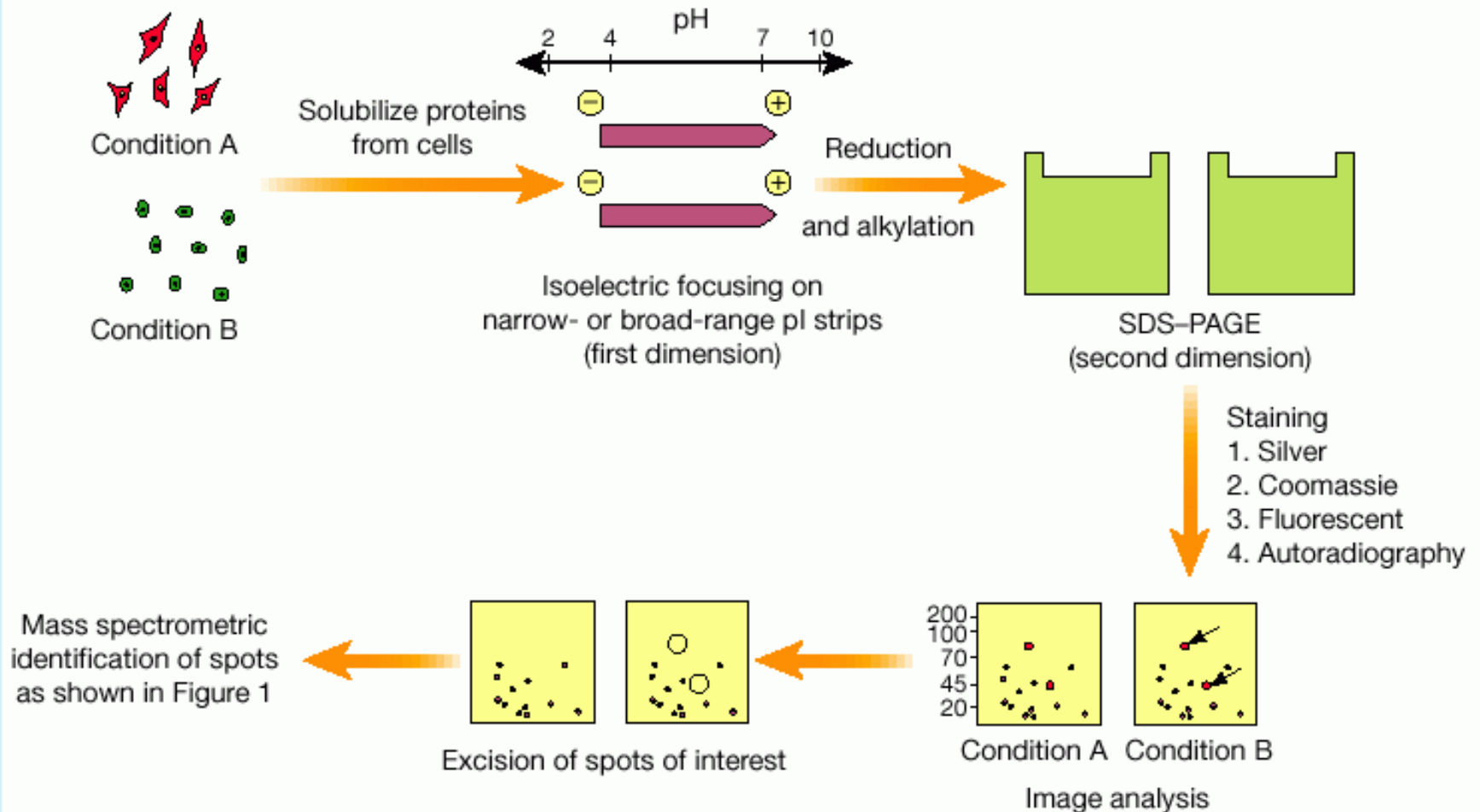


Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων (2D)

Η μέθοδος επιτυγχάνει διαχωρισμούς υψηλής διακριτικής ικανότητας και αποτελεί ένα από τα πρώτα πειραματικά βήματα που θα καταλήξουν στην πρωτεομική, δηλαδή τη μελέτη του συνόλου των πρωτεϊνών ενός οργανισμού



Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων (2D) - Εφαρμογές



Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης 2 διαστάσεων (2D)

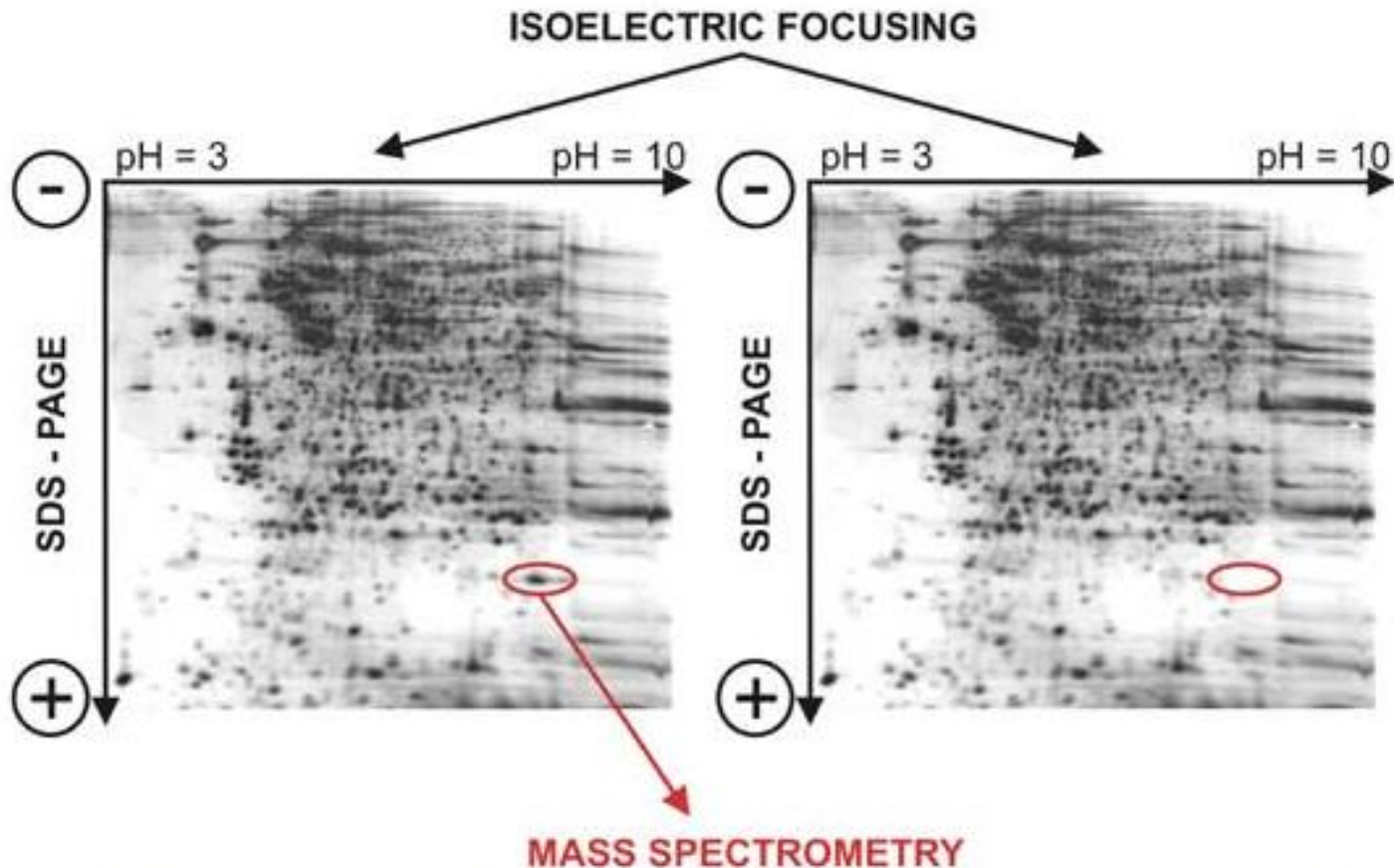


Figure 2. 2D electrophoresis. After isoelectric focusing in pH gradient of the electric field the electrophoretic separation is used in polyacrylamide gel (SDS-PAGE....sodium dodecylsulphate - polyacrylamide gel electrophoresis). Proteins can be visualized after staining (on the picture in Coomassie blue).