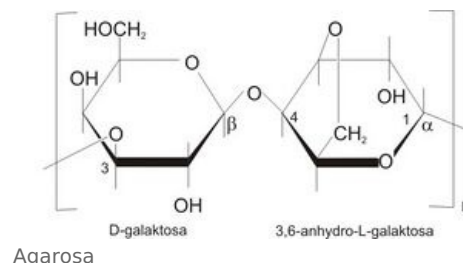


Elektroforéza nukleových kyselin

Úseky DNA, produkty PCR reakce nebo štěpy DNA můžeme v zásadě dělit chromatograficky nebo elektroforézou. Elektroforetické dělení je mnohem používanější. Provádí se zpravidla v gelu, a to buď agarosovém, nebo polyakrylamidovém. V obou případech se molekuly, které v zásaditém prostředí nesou záporný náboj, pohybují v elektrickém poli od katody k anodě. Gely tvoří poměrně hustou síť, kterou větší molekuly procházejí pomaleji než menší molekuly – mluvíme proto o technice **molekulového síta**.

Elektroforéza v agarosovém gelu

Agarosa je polysacharid tvořený D-galaktosou a anhydro-L-galaktosou, který produkují některé mořské řasy a pod názvem agar se používá k výrobě gelů v potravinářství, mikrobiologii, imunologii či biochemii. Pro elektroforézu nukleových kyselin se používají gely obsahující 0,5 až 4 % agarosu. Čím je obsah polysacharidu vyšší, tím je lepší rozlišovací schopnost gelu, ale tím je také průběh elektroforézy pomalejší a příprava gelu je technicky náročnější.



Volba koncentrace agarosového gelu pro elektroforézu DNA

Obsah agarosu v gelu	Délka DNA
0,5 %	1–30 kbp
0,7 %	0,8–12 kbp
1,0 %	0,5–10 kbp
1,2 %	0,4–7 kbp
1,5 %	0,2–3 kbp
2,0 %	50 bp–2 kbp
3–4 %	10 bp–1 kbp

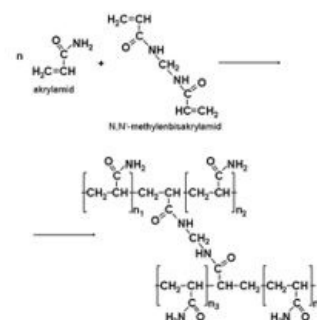
Do agarosového gelu se většinou přímo přidává ethidiumbromid, takže po skončení elektroforézy lze jednotlivé frakce zobrazit UV zářením. Jinou možností detekce je blotting na membránu a následné obarvení nukleových kyselin nebo hybridizace se značenými sondami.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Jiným nosičem používaným při elektroforéze nukleových kyselin je **polyakrylamidový gel**. Polymerací akrylamidu vznikají lineární molekuly polyakrylamidu. Ty se spojují příčnými můstky, které vznikají kopolymerací s N,N'-metylenbisakrylamidem. Akrylamid i metylenbisakrylamid jsou poměrně stabilní látky; polymerace probíhá v nepřítomnosti vzdušného kyslíku (odstraní se odvodušením pomocí vakua) a zahajuje se přímíšením katalyzátorů peroxydisíranu amonného (známého pod starším názvem persíran amonný, krátce APS) a N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu (TEMED).

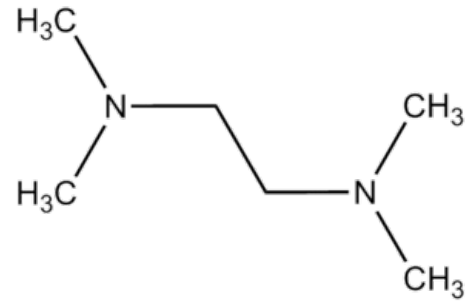
APS ve vodném roztoku s TEMED uvolňuje volné kyslíkové radikály, které atakují molekuly akrylamidu a bisakrylamidu a spouštějí tak jejich polymeraci.

Molekulové síto polyakrylamidového gelu je poměrně husté, hodí se proto pro rozdělování kratších fragmentů.



Volba koncentrace
polyakrylamidového gelu pro
dělení DNA

Polyakrylamid	Délka DNA
3,5 %	1–2 kbp
5 %	75–500 bp
8 %	50–400 bp
12 %	35–250 bp
15 %	20–150 bp
20 %	5–100 bp



TEMED

Díky tomu, že polyakrylamid je méně reaktivní než agarosa, lze fragmenty DNA kromě metod používaných v agarosovém gelu obarvit i dalšími technikami. Z klasických metod patří mezi nejcitlivější stříbření, kterým lze detekovat množství DNA i o několik řádů nižší než ethidiumbromidem.

Odkazy

Související články

- Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
- Polymorfismus konformace jednoduchých řetězců
- Elektroforéza bílkovin v séru
- Polymerasová řetězová reakce