



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

MOLEKULÁRNÍ METODY V EKOLOGII MIKROORGANISMŮ (EKO/MMEM)

DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je technologie umožňující separaci molekul DNA v polyakrylamidovém gelu na základě odlišné sekvence nukleotidů, resp. poměru CG:AT bází. Gel obsahuje lineární gradient koncentrace denaturačního roztoku, zpravidla formamidu a močoviny. DGGE je hojně využívaná metoda, např. v mikrobiální ekologii nebo analytice bílkovin, ke zjištění homogenity preparátu a částečně také k fyzikálně-chemické charakterizaci bílkoviny.

V oblasti mikrobiální ekologie vody je DGGE používána především pro analýzu málo diverzifikovaných přírodních společenstev. Výhodou DGGE je, že umožňuje identifikovat vybrané dominantní skupiny, např. vyříznutím bandu, reamplifikací a sekvenováním DNA a tím poskytuje informace i o dosud neznámých skupinách, pokud jsou amplifikovány.

PAGE

DGGE je jednou z nejužívanějších metod tzv. PAGE (polyakrylamidové gelové elektroforézy). Jedná se o vertikální elektroforézu, kdy použitým elektroforetickým médiem je polyakrylamidový gel. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě v pufru (TAE) pomocí volných radikálů poskytovaných persulfátem amonným (APS), který způsobuje homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada TEMED (tetrametylendiamin), který katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Konečné koncentrace TEMEDu a APS v polymerizačním roztoku by měly být 0,05%. Použitá koncentrace akrylamidu se liší podle velikosti separovaných fragmentů DNA. V případě různé velikosti separovaných molekul se pak vhodně zvolená koncentrace gelu stává dalším faktorem ovlivňujícím separaci. Experimentální uspořádání elektroforézy gelu je

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

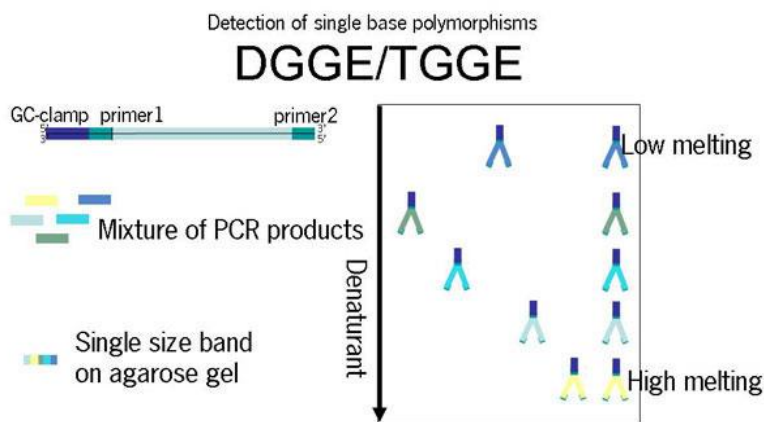
CZ.1.07/2.2.00/28.0032

tzv. plošného typu, neboť gel je rozprostřen v tenké vrstvě mezi skleněnými deskami. Elektroforéza se provádí ve speciálních aparátech, v nichž se nosič se vzorkem k separaci umístí mezi dvě elektrody, mezi nimiž prochází stejnosměrný proud.

Princip DGGE

Dvouvláknová DNA putuje gelem rychlostí určenou její molekulovou hmotností až do doby, než vstoupí do části gelu s koncentrací denaturačních látek způsobující denaturaci dvouvláknové (ds) DNA na jednovláknovou (ssDNA). Rychlost denaturace DNA závisí na počtu vodíkových můstků mezi nukleotidy. Řetězce DNA se od sebe budou snáze oddělovat v místech bohatých na AT páry (dva vodíkové můstky), zatímco úseky bohaté na GC budou stabilnější (tři vodíkové můstky).

Vznikající denaturovaná vlákna putují při elektroforéze mnohem pomaleji, takže čím snáze se určitý úsek denaturuje, tím blíže startu se vzorek DNA zastaví. Konečná pozice fragmentu DNA v gelu závisí tedy na denaturačním bodu. Protože zcela oddělená vlákna ssDNA by vytvořila neostré proužky, používají se při amplifikaci DNA primery s tzv. GC-svorkou (viz Obr. 1). PCR produkt pak obsahuje dvoušroubovice, které mají na jednom konci pouze GC páry; v tomto místě se řetězce denaturují jen nesnadno. Používají se dva typy DGGE.



Paralelní gely, ve kterých se zvyšuje koncentrace denaturačních činidel lineárně od shora dolů pomocí dvou samostatných paralelních gelů; a tzv. perpendikulární gely, ve kterých se zvyšuje koncentrace denaturačních činidel lineárně zleva doprava napříč gelem.

Obr. 1 Schéma DGGE s naznačenými GC-svorkami na jednom konci vlákna



evropský
sociální
fond v ČR



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Paralelní gely jsou vhodné k vyšetření několika vzorků. Po nabarvení gelu fluorescenčním barvivem (EtBr, SYBR Green) je výsledek vizualizován a zachycen pomocí transiluminátoru s UV zářením a snímací technikou. Pomocí speciálního software je obraz analyzován a je stanovena diverzita společenstva podle množství a intenzity vzniklých proužků (bandů), z nichž každý představuje určitou mikrobiální skupinu společenstva.

TGGE

Teplotní gradientová gelová elektroforéza (TGGE) je metoda schopná na základě chování molekul v lineárně rostoucím teplotním gradientu separovat rozdílné molekuly nejen dle náboje a velikosti, ale i v závislosti na konformačních změnách. Na rozdíl od DGGE zde denaturaci nezpůsobuje koncentrace denaturantu, ale měnící se teplota. Opět se používají dva typy TGGE - paralelní a perpendikulární.

Kapilární elektroforéza

Jedná se o alternativní metodu separace fragmentů DNA. Separace probíhá v lineárním hydrofilním polymeru v kapiláře (vnitřní průměr 25 - 50 μm , délka několik cm až 1 m) a elektroforetickém pufru podle molekulové hmotnosti. Pro separaci jednovláknové DNA se používá pufr obsahující ureu (7 mol/l).

POSTUP: Gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Nutno používat vždy čerstvě umyté sklo a rukavice!

1. Sestavení kazety

Na pečlivě saponátem umytou, etanolem (ev. acetonem) očištěnou a dokonale suchou zadní skleněnou desku (s větším výřezem, výřez nahoru) se vloží „spacer“ tak, aby kryl okraje desky. Na něj se přiloží přední skleněná deska (stejně umytá jako zadní) výřezem dolů. Celá soustava se vloží do DGGE kazety s plastovým U profilem (přítlačná lišta), který musí vždy směřovat od středu kazety ven. Pak se zatlačí na horní okraj desek, zatímco spacer je vytahován směrem nahoru. Tím dojde k jeho srovnání mezi skleněnými deskami. Přitáhnou se



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

2 horní šrouby na obou stranách a pak ostatní šrouby na spodní straně kazety. Nakonec se vloží hřebínek.

2. Příprava roztoků pro vlastní gel

Zvolí se rozmezí gradientu (rozdíl by měl být vždy větší než 20%) a koncentrace polyakrylamidu (je závislá na velikosti fragmentů, nejčastěji se používá 6% nebo 8% polyakrylamid). Podle tabulky se namíchá 24 ml gelu s nízkým a 24 ml s vysokým obsahem denaturantů, celkem tedy 48 ml gelu.

Koncentrace denaturantů (%)	0% U/F roztok (ml)	80% U/F roztok (ml)
20	18	6
25	16,5	7,5
30	15	9
35	13,5	10,5
40	12	12
45	10,5	13,5
50	9	15
55	7,5	16,5
60	6	18
65	4,5	19,5
70	3	21
75	1,5	22,5

Máme tedy dva roztoky: roztok s nízkou koncentrací (**L**ight) a vysokou koncentrací (**H**eavy) denaturantů (např. 45% a 65%).

Např. příprava 45% koncentrace (L) => do 50 ml zkumavky napipetujeme 10,5 ml 0% roztoku a 13,5 ml 80% roztoku

příprava 65% koncentrace (H) => do 50 ml falkonu napipetujeme 4,5 ml 0% roztoku a 19,5 ml 80% roztoku

3. Zapojení čerpadla a směšovací komor

Před nalitím gelu je nutné zapnout pumpu a aparaturou nechat protéct cca 25 ml vody. Provádíme cca 15 min před naléváním gelu. Tím dojde k odstranění vzduchu a zbytkové vody



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

k pročištění zařízení a ověří se průchodnost aparatury – v případě nutnosti se vymění jehla. Po průtoku vody aparaturou se zvolí optimální poloha směšovací komory pro roztok s vyšší koncentrací denaturantu (označeno H – vloží se magnetická tyčinka) na magnetické míchače (míchadlo musí volně a plynule rotovat). Otočný kohout spojující směšovací komory (L a H) se nastaví do svislé polohy (tj. uzavře se, komory jsou odděleny). Vypne se pumpa i magnetická míchačka a aparatura je po vložení koncové jehly mezi skla (pod úroveň zubů hřebene) připravena k nalití roztoků gelu.

4. Nalítí gelu

V digestoři se ke každému z roztoků (L i H) přidá **12 µl** TEMEDu a **75 µl** 20 % APS a roztoky se promísí (netřepat!). Gel začne polymerovat a je nutno pokračovat rychle.

Do směšovací komory **L** (dál od pumpy) se nalije roztok s nižší koncentrací denaturantu. Lehce se pootočí spojovací kohout tak, aby malé množství roztoku přeteklo do vedlejší komory (H) kvůli odvodu vzduchu spojovacího ventilu – příp. bublina by mohla bránit vytvoření plynulého gradientu. Kohout se opět uzavře. Do vedlejší komory **H** (blíže k pumpě) se nalije roztok s vyšší koncentrací denaturantu a zapne se míchání tak, aby na hladině nevznikal vír. Zcela se otevře spojovací kohout a zapne se pumpa.

Během napouštění gelu je dobré sledovat a korigovat rychlost otáček míchadla, s klesající hladinou se zvyšují otáčky a vytváří se vír v komoře H, který může narušit plynulost gradientu.

Gel se napustí cca 4 mm pod úroveň hřebene (nalití trvá asi 15-20 min.) a vypne se pumpa. Zbytek gelu se napustí do 2 ml zkumavky, jako kontrola polymerace. Po práci s gelem je **nutné čerpadlo propláchnout vodou**.

Hladina gelu pod hřebenem se po cca 20 min převrství pomocí pipety vodou (asi 2 ml). Gel zpolymeruje asi po 90 min (lépe však nechat polymerovat alespoň 3 hodiny).

5. Zapnutí lázně DGGE

Přístroj pro DGGE se zapne asi 1-1,5 hodiny před spuštěním elektroforézy, tj. mezi nalitím vlastního dělicího gelu a stacking gelu – nutné zahřát TAE pufr ve vaně na 60 °C, ev. jinou teplotu dle metodiky.

Pozn.: Vana obsahuje 17 L pufru, který je nutné měnit po cca čtyřech analýzách, ev. po každém použití vyměnit 4 L 1x TAE pufru za čerstvý. (Na 17 L pufru: 340 ml 50x TAE doplnit do 17 L vodou; na 4 L pufru: 80 ml 50x TAE doplnit do 4 L vodou)

POZOR – pokud by vana neobsahovala pufr, ale pouze vodu, nenačte se teplotní čidlo.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

6. Stacking gel

Po ukončení polymerace vlastního dělicího gelu se vysune hřeben a voda nad gelem se odsaje čistými pruhy filtračního papíru. Hřeben se nasadí zpět mezi skla a prostor kolem něj se vyplní tzv. **stacking gelem**.

Stacking gel: **5 ml** 0% zásobního roztoku

7 μ l TEMEDu

25 μ l 20% APS

Roztok APS je nutno přidat těsně před naléváním. **POZOR – polymerace je velmi rychlá!** Pipetou se napipetuje stacking gel na vrchní část gelu v kazetě. Asi po 20 min. je gel připraven na další práci.

POZN.: Roztok APS se nesmí vícekrát zamrazovat, po namíchání se rozpipetuje do alikvot (např. po 200 μ l do mikrozkušavek, po použití se zbytek vyhodí).

7. Vložení kazety s gelem do přístroje

Pokud se nalévá jen jeden gel, je nutné druhou buňku pro skleněný sandwich vyplnit tlustostěnnou skleněnou deskou a utáhnout šrouby. Po ztuhnutí stacking gelu se vysune hřeben a na kazetě se povolí všechny šrouby. Kazeta se vloží do předehřáté vany přístroje. Před vložením zkontrolujte orientaci elektrod DGGE kazety vůči poloze kabelů uvnitř DGGE lázně (anoda (+) má uvnitř vany krátký kabel a tomu musí odpovídat i orientace kazety při vložení). Spacer mezi skleněnými deskami a gelem se zatlačí na dno kazety a tím dojde k uvolnění spodní hrany nalitého gelu. Utáhnou se dva horní šrouby. Kazeta se mírně nadzdvihne a nakloní, tím dojde k odstranění bublin, které se obvykle vytvoří mezi spodní stranou gelu a spacerem. Na vrchol kazety se **připojí hadice** čerpadla a napustí se TAE pufr z vany (otevřít se na boku přístroje). Po naplnění odtéká přebytečný pufr otvory na bocích kazety. **Čerpadlo se zastaví**.

8. Nanesení vzorků a zapnutí přístroje

Na gel se nanáší cca **5-20 μ l** vzorku (podle čistoty a intenzity PCR produktů) smíchan s 3-7 μ l barvičky (např. 6x loading dye). Při použití hřebínku s 32 zuby lze nanést max. 26 vzorků, při použití 20 zubů max. 14 atd. Na každou stranu nebo do středu je dobré použít DGGE marker, z každé strany vnějších markerů (nebo posledních vzorků) je vhodné použít tzv. dummies – např. 5 μ l 6x Loading Dye nebo jiných vzorků.

Při **nanášení vzorků** je nutné přepnout na přístroji režim **LV** (low voltage), který udržuje vzorky při nanášení v jamkách.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

9. Zapojení přístroje

Připojí se vnitřní **elektrody** DGGE vany na kazetu přístroje a přiklopí se víko. **POZOR - nezapomeň** přepnout na režim **HV** (high voltage)! Poté se připojí vnější kabely na elektrický zdroj, pustí se cirkulace pufu otočením kohoutu, aby se opětovně naplnila kazeta pufrem. Jakmile je kazeta naplněna, čerpadlo se zastaví. Na elektrickém zdroji se nastaví 110V (ev. jiné napětí podle metodiky) a zapne se na cca 10 min - slouží k rychlému zasetí vzorku do vrstvy stacking gelu. Po zasetí vzorků se zapne **naplno cirkulace pufu**. Na el. zdroji se nastaví požadované napětí a doba běhu se zvolena podle metodiky (např. 95 V po dobu 16 hod).

10. Vypnutí přístroje

Po 16 hod. se vypne pumpa, hlavní vypínač DGGE a el. zdroj. Od kazety odpojíme přírodní hadici a vnitřní elektrody a vyjmeme ji z vany přístroje. Kazetu je dobré ponechat vychladnout na vzduchu cca 15 min. Povolí se šrouby a skleněný sandwich s gelem se vyjme a položí na rovnou podložku s filtračním papírem. Odstraní horní skleněná deska a poté se vyjme spacer. Odstraní se přebytečné oblasti gelu (stacking gel) a označí levý horní roh.

11. Barvení gelu

Gel se barví na spodní skleněné desce pomocí roztoku 1xTAE pufu z DGGE vany (**25 ml**) + **4 µl SYBR Greenu** po dobu 60 min (při cca 80 rpm). Po dobu barvení je nutné zamezit přístupu světla (miska překrytá alobalem). Po obarvení se vrchní strana gelu opláchne destil. vodou a gel je připraven k analýze pod UV. Plochu iluminátoru je vhodné před položením gelu navlhčit vodou pro snadnou manipulaci.

12. Příprava zásobních roztoků

6% polyakrylamid	zásobní roztoky		8% polyakrylamid	zásobní roztoky	
	0%	80%		0%	80%
Močovina	-	50,4 g	Močovina	-	50,4 g
Formamid	-	48 ml	Formamid	-	48 ml
50x TAE, pH 7,8	3 ml	3 ml	50x TAE, pH 7,8	3 ml	3 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid	22,5 ml	22,5 ml	40% Acrylamid/Bisacrylamid	30 ml	30 ml
Doplnit dH ₂ O do	150 ml	150 ml	Doplnit dH ₂ O do	150 ml	150 ml

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Pozn.: při přípravě 80% zásobních roztoků je nutné pro rozpuštění močoviny (míchat nebo i zahřívát) přidat dostatečné množství H₂O, cca 130 ml a po rozpuštění doplnit do 150 ml. Roztoky se uchovávají v temnu (láhev obalená alobalem), při pokojové teplotě nebo v lednici.

Další roztoky a chemikálie		
50x TAE	APS (amonium persulfát)	N,N,N' – tetramethylethylen diamine (TEMED)
242 g Tris 100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) 57,1 ml ledové kys. octové doplnit do 1L vodou (pH 7,8)	20% (w/v) v MQ a rozdělit po 200 µl do mikrozkušavek a uchovat při – 20°C	skladuje se při pokojové teplotě

Potřebný materiál:

10 ml skleněná nebo jednorázová plastová
pipeta
nasávací pryžový balónek
mikropipeta 2-20 µl + špičky
mikropipeta 20-200 µl + špičky
mikropipeta 1000-5000 µl + špičky
50 ml zkumavky
15 ml zkumavky
pracovní rukavice nitrilové
pruhy filtračního papíru
magnetické míchadlo
příslušenství DGGE elektroforézy

Chemikálie:

močovina
formamid
acrylamid/bisacrylamid
tris base
0,5M EDTA
ledová kys. octová
TEMED
20% APS
6x loading dye
SYBR Green
etanol
deionizovaná voda - dH₂O

Doporučená literatura:

- Osborn A. M., Smith C. J., 2005. Molecular Microbial Ecology. Taylor& Francis Group, New York USA.
- Willey J., Sherwood L., Woolverton C (2008): Prescott - Harley - Klein's Microbiology (7 Rev Ed.), Mcgraw-Hill Education - Europe (United States)
- <http://ddgehelp.blogspot.com/2005/11/dgge-guide.html>
- http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/dgge/dgge1.html
- <http://www.wikiskripta.eu/index.php/DGGE>
- <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm#gel>