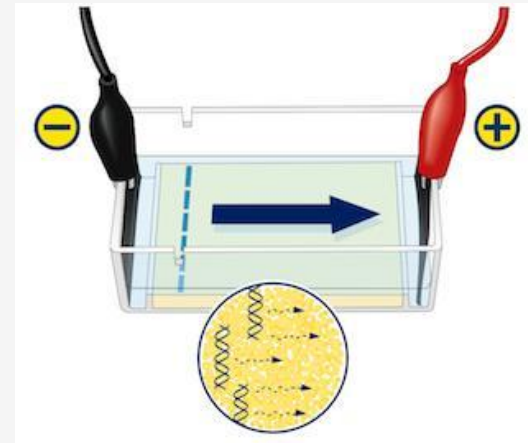


МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина  
ИНСТИТУТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Департамент «БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ»  
Кафедра физиологии и биохимии растений

# Электрофоретическая подвижность ДНК в гелях

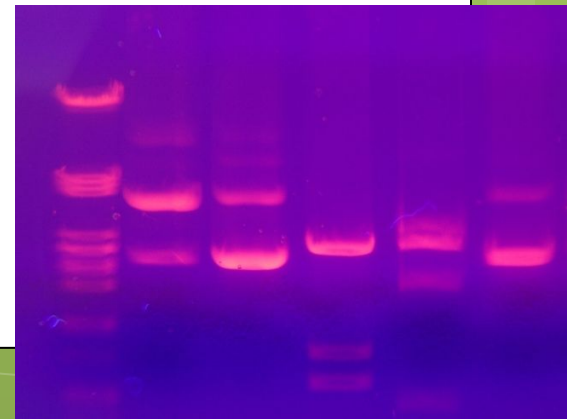


Выполнила: Санаева  
Юлия,  
магистрант 1 года

Екатеринбург  
2014

# Электрофорез в гелях

- метод, который служит для разделения макромолекул на основе их размера, электрического заряда и других физических свойств.
- «электро» + «форез» (греч. Phoros - «переносить»)
- метод, в котором молекулы вынуждены перемещаться через пространство геля под воздействием электрического тока



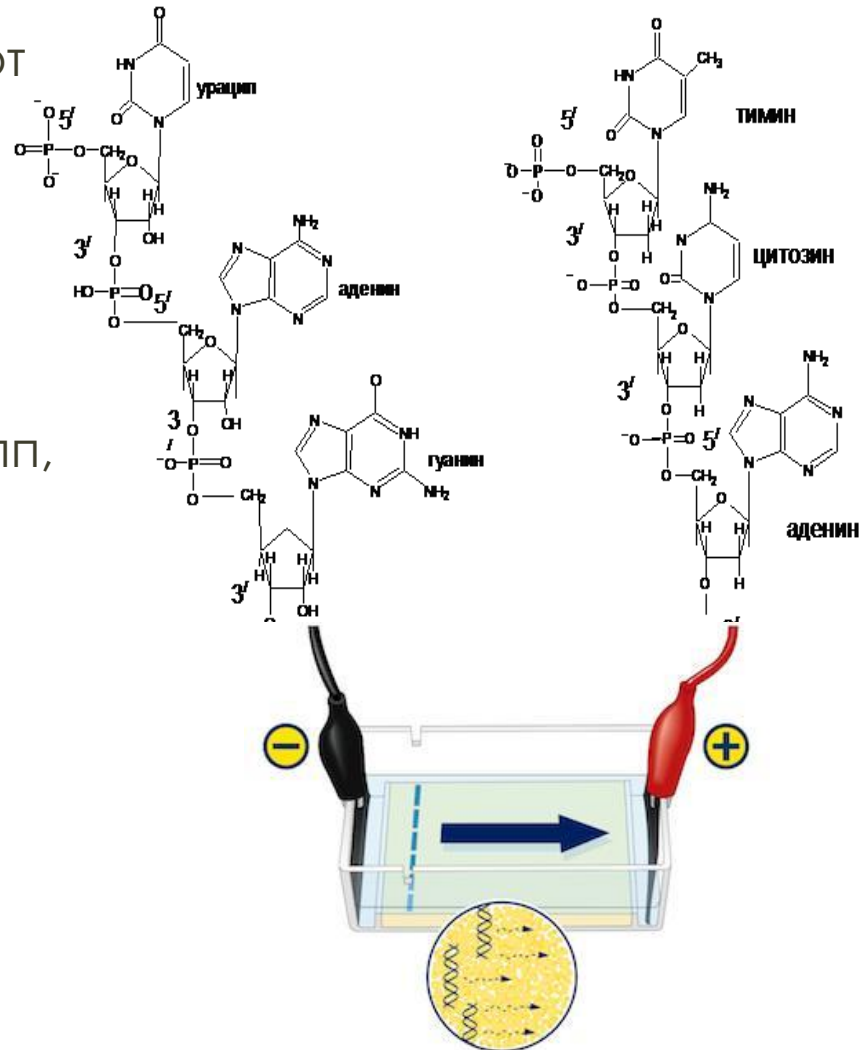
# Основные принципы метода

В составе нуклеиновых кислот и белков присутствуют химические группы, обладающие в водном растворе электрическим зарядом.

Величина общего заряда молекулы определяется количеством заряженных групп, их природой, а также pH раствора.

В нуклеиновых кислотах в широком диапазоне pH на каждую фосфатную группу приходится заряд  $-1$ .

Под действием внешнего электрического поля заряженные молекулы могут перемещаться к катоду или аноду, в зависимости от их суммарного заряда.



# Электрофоретическая ПОДВИЖНОСТЬ

 $d/t$  $E$ 

- **скорость движения молекулы в поле единичной напряжённости**
- Именно различия в электрофоретической подвижности различных биологических молекул часто используются для разделения их смесей.

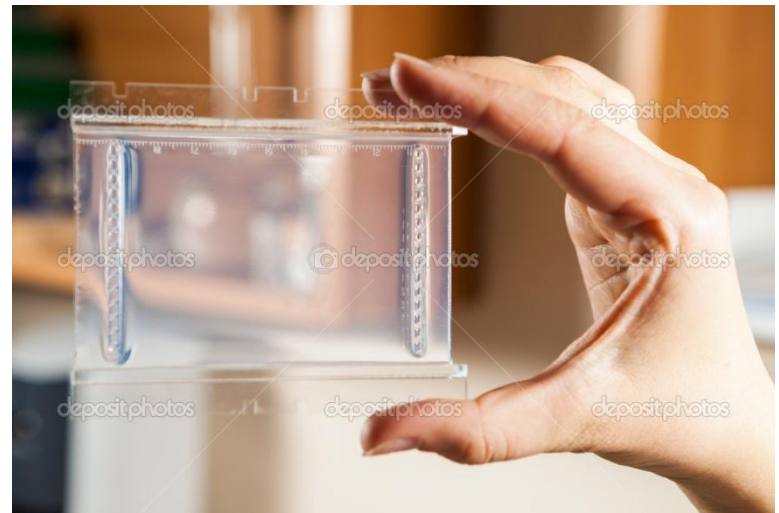
$$U = \frac{d}{Et}$$

где

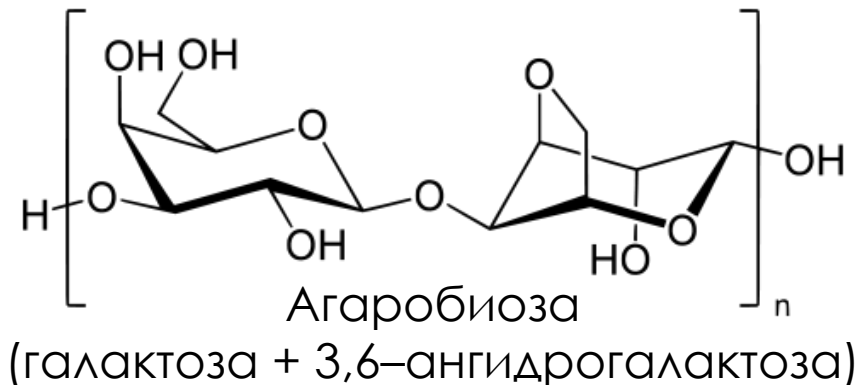
- $U$  – электрофоретическая подвижность ;
- $d$  – расстояние (см), пройденное образцом в геле;
- $E$  – напряжённость электрического поля (В/см) в межэлектродном пространстве;
- $t$  – время миграции (сек).

# Типы гелей, используемых для электрофореза ДНК

- Агарозный гель
- Полиакриламидный гель
- Смешанные гели

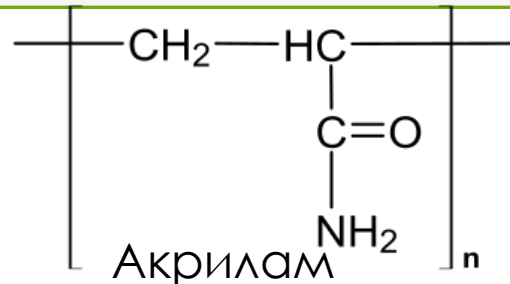


# Агарозный гель



- Агароза – линейный полисахарид (~12 000 Да),
- Образование геля идёт путём связывания в пространственную сетку пучков нитей, за счёт образования водородных связей между ними.
- Агарозные гели имеют «поры» большого размера и используются для разделения больших молекул (>200 кДа).
- Разделение происходит быстро, но с ограниченным разрешением, т.к. полосы имеют тенденцию размываться (результат большого размера пор).
- Агарозные гели менее, чем полиакриламидные среды, чувствительны к случайным флуктуациям в макроструктуре молекул ДНК.

# Полиакриламидный гель



удается разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся даже на один нуклеотид (секвенирование)

Полиакриламидные гели

Денатурирующие

Нативные

«-» эффект «разделения цепей»,  
(индивидуальные фрагменты ДНК представлены двумя полосами)

чувствительны к пространственно-конформационным параметрам молекул ДНК (по ср. с агарозными) □ электрофоретическое поведение ДНК сильно зависит от нуклеотидного состава (эффект аномальной подвижности □ позиционные несоответствия)

# Смешанные гели

- При разделении крупных нуклеопротеиновых комплексов или частиц используют смешанные гели, состоящие из агарозы (ок. 0.5%) и полиакриламида (1.5% - 2.5%)
- Агароза выполняет лишь функцию механического каркаса, который не нарушает эффект молекулярного сита, создаваемого сеткой ПААГ.
- Для образования такой структуры надо обеспечить условия, при которых агароза затвердевает раньше, чем полимеризуется ПААГ.



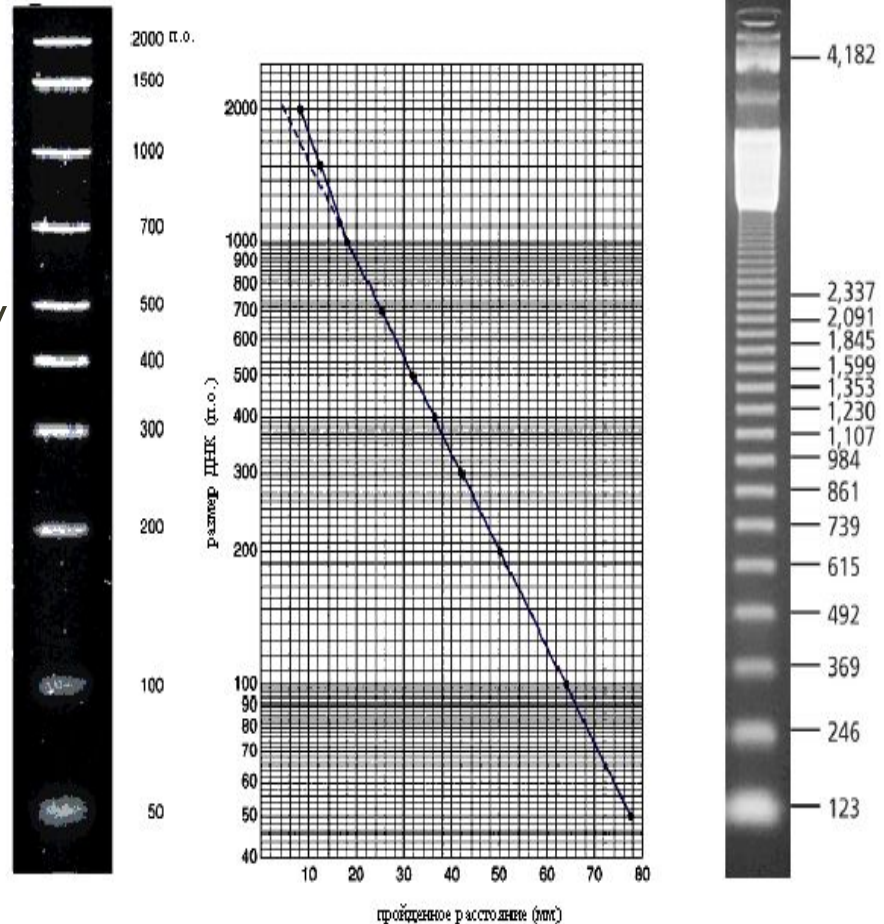
# Факторы, определяющие скорость миграции ДНК через агарозный гель

1. Размер молекул ДНК
2. Концентрация агарозы
3. Конформация ДНК
4. Напряженность электрического поля
5. Состав оснований и температура
6. Концентрация ДНК в пробе
7. Характер растворителя

# Размер молекул ДНК

Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс, а следовательно, и размеру.

**НО:** молекулы ДНК должны достаточно свободно мигрировать в геле, лишь изредка сталкиваясь с его волокнами.



# Концентрация агарозы

- соотношение Фергюсона устанавливает линейную зависимость между логарифмом электрофоретической подвижности ( $U$ ) и концентрацией геля ( $T$ ):

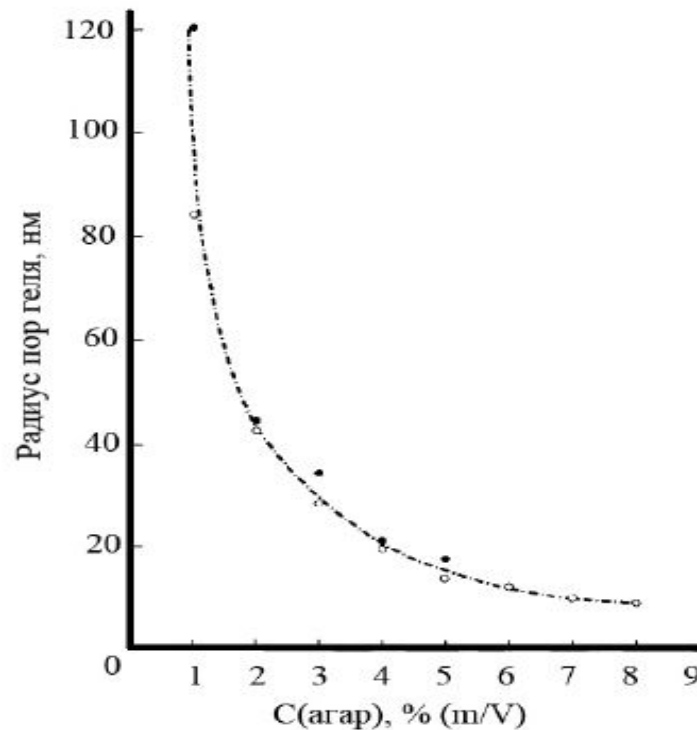
$$\log U = \log U_0 - KRT, \text{ где}$$

- $U_0$  – электрофоретическая подвижность частицы в отсутствие геля;
- $KR$  – коэффициент ретардации, зависящий от свойств геля, а также размеров и формы молекулы.
- В горизонтальных гелях агароза обычно используется в концентрации от 0.7% до 3%

## Рекомендуемая концентрация агарозного геля для разделения линейных молекул ДНК

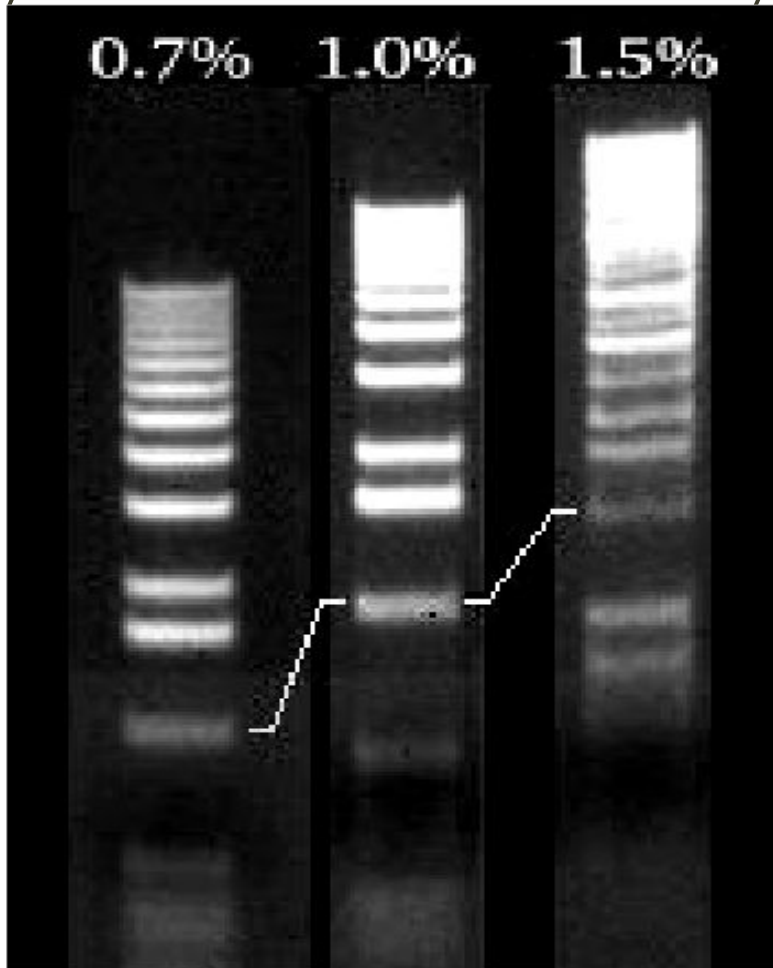
Концентрация агарозы, %	Диапазон размеров ДНК (н.п.)
0.75	10 000 – 15 000
1.00	500 – 10 000
1.25	300 – 5 000
1.50	200 – 4 000
2.00	100 – 2 500
2.50	50 - 1 000

## Чем больше концентрация агарозы, тем меньше размер пор в геле



Изменение эффективного радиуса пор в зависимости от концентрации агарового геля. ○ радиусы, рассчитанные на основании опытов с гемоглобином,  $a = 3.08$  нм; ● радиусы, рассчитанные на основании опытов с вирусом южной мозаики фасоли,  $a = 14.0$  нм.

НО: чрезмерное увеличение концентрации агарозы может привести к ухудшению разделения, или даже к тому, что крупные молекулы ДНК совсем не смогут войти в поры геля.



Разделение одной пробы в агарозном геле различной концентрации (0.7 %, 1.0 % и 1.5%). С ростом концентрации геля разделение более длинных фрагментов ДНК ухудшается

# Конформация ДНК

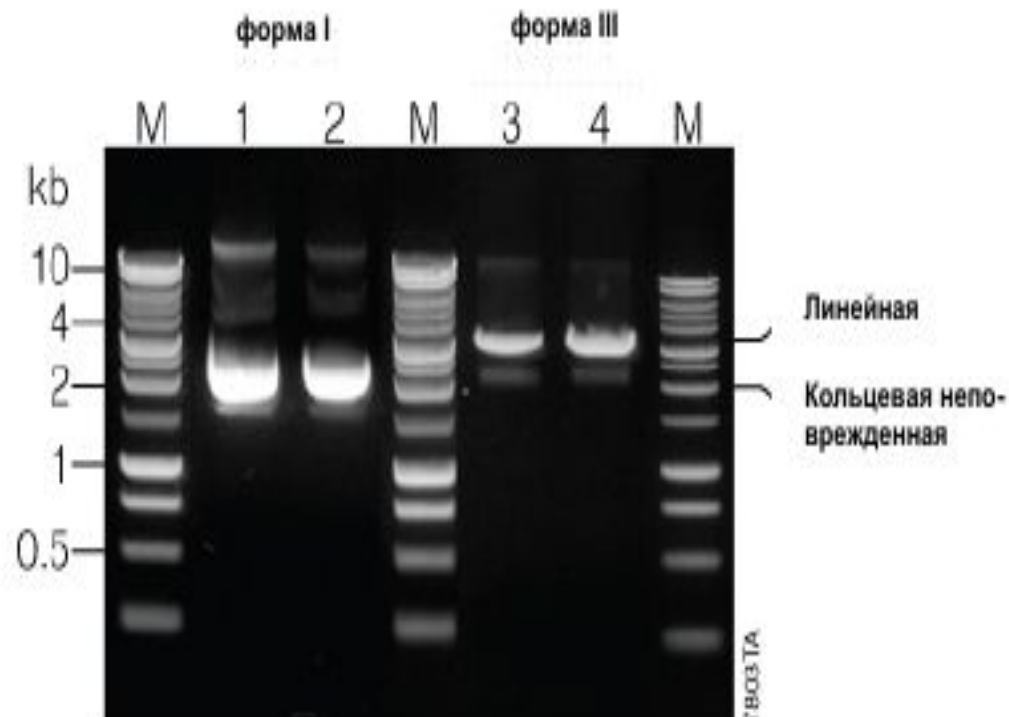
M=const

разные конформации:

- кольцевая неповрежденная (форма I),
- кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II)
- линейная (форма III),

Разная электрофоретическая подвижность

- линейная форма (форма III) мигрирует медленнее всех

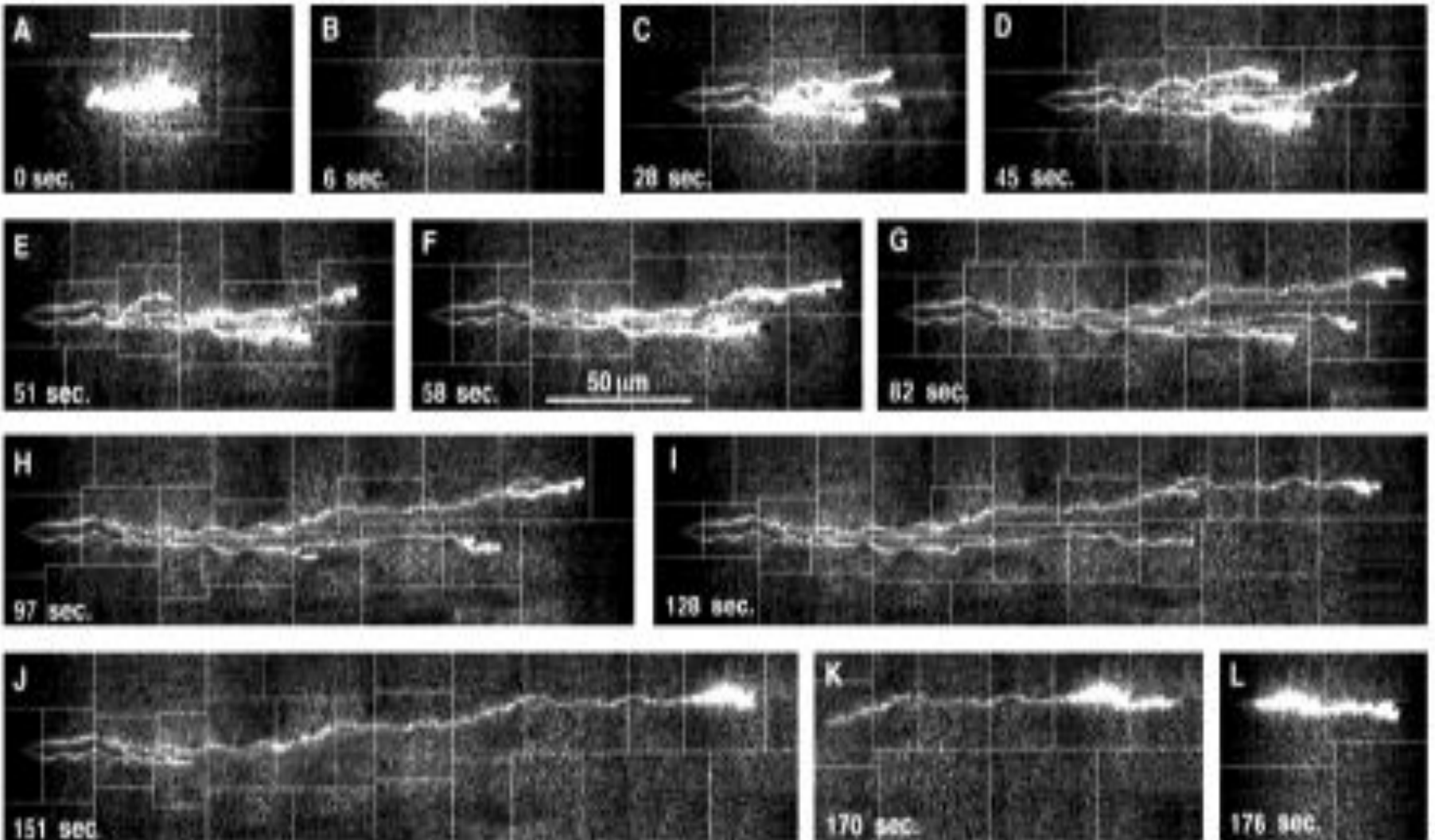


# Напряженность электрического поля

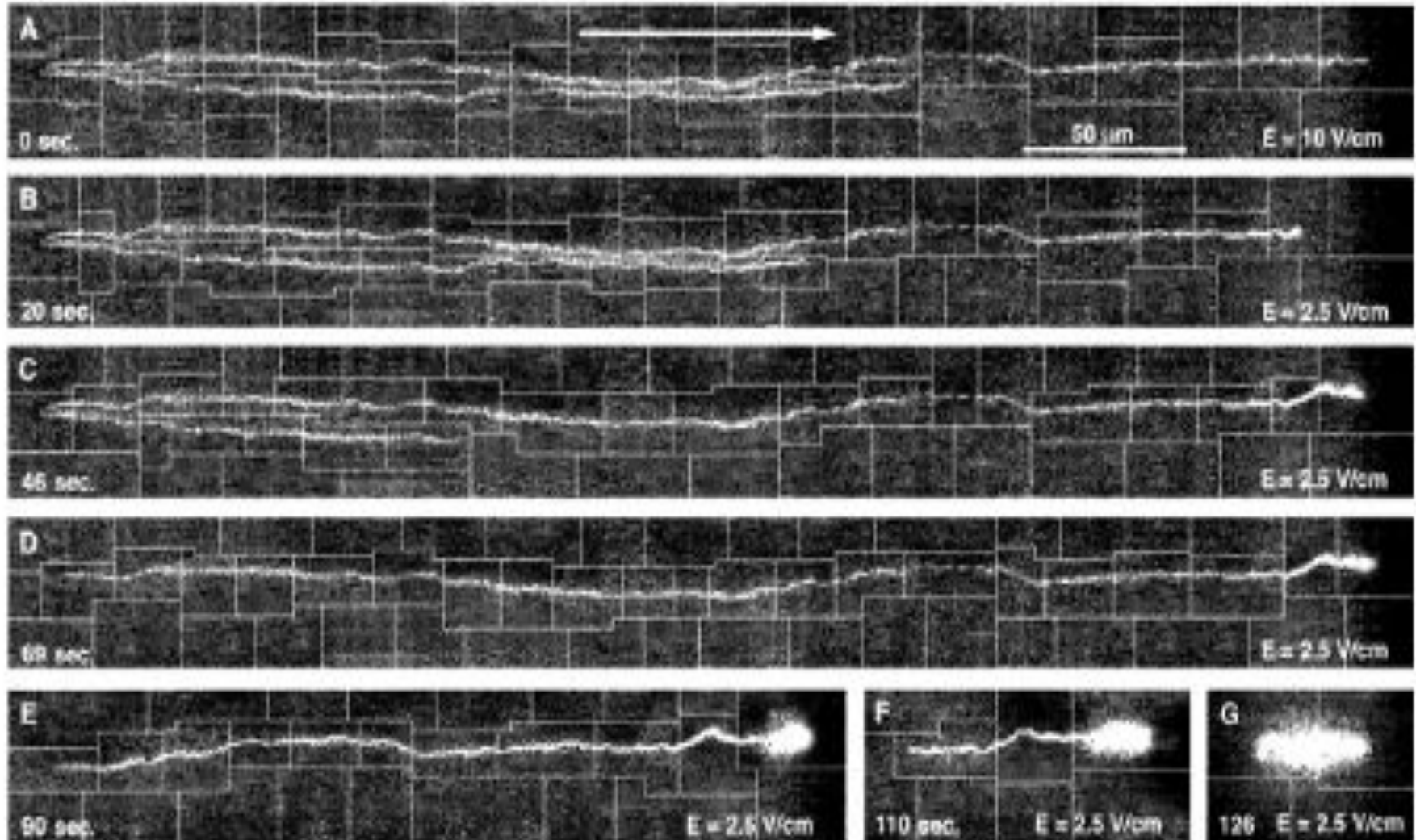
- При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению.
- **НО:** увеличение напряженности поля приводит к тому, что более длинные молекулы начинают догонять более короткие □ ухудшение разделения .
- Opt: **5 В/см.**
- При 10 в/см :
  - полная остановка больших молекул ДНК.



Различные стадии миграции молекулы ДНК в агарозном геле. Напряжённость электрического поля 5 в/см



# Остановка молекулы ДНК в агарозном геле при напряжённости электрического поля 10 в/см



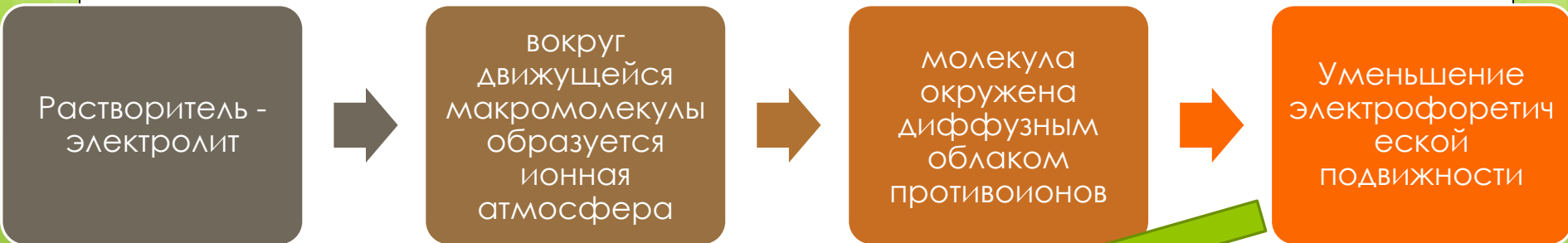
# Состав оснований и температура

- Слабая зависимость
- В агарозных гелях при 4 – 30°C изменения относительной электрофоретической подвижности ДНК не наблюдается.
- Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре.
- **НО:** гели, содержащие менее 0,5% агарозы, очень мягкие, поэтому с ними работают при 4°C (они становятся более плотными).

# Концентрация ДНК в пробе

- Недостаточная концентрация □ не визуализируем ДНК.
- Избыточное количество ДНК □
  1. бóльшая электрофоретическая подвижность
  2. искажается (размывается) форма полосы, а после окрашивания интенсивность её свечения перестаёт напрямую соответствовать количеству окрашенной ДНК.
- 2-500 нг в полосе шириной 0.5 см

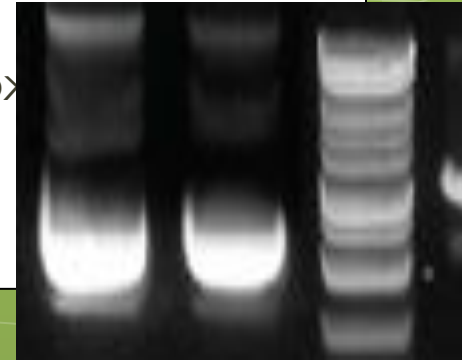
# Характер растворителя



1. облако противоионов частично экранирует заряд самой молекулы и ослабляет действие на неё электрического поля.
2. само облако противоионов, обладая противоположным по отношению к молекуле зарядом, будет взаимодействовать с электрическим полем и смещаться в противоположную сторону, тормозя движение молекулы (явление электрофоретического трения).
3. при движении молекулы отдельные ионы вокруг неё тоже непрерывно перемещаются □ в ионной атмосфере происходит непрерывное замещение ионов. Для вновь входящих ионов требуется время, чтобы найти своё место в поле макромолекулы и прийти в равновесие с её окружением, что приводит к нарушению сферически симметричной формы ионной атмосферы. В результате, двойной электрический слой позади частицы растягивается и тормозит её движение (явление релаксационного эффекта)

# СДВИГ ПОЛОС

- в процессе электрофореза фрагменты ДНК в одной дорожке геля движутся быстрее или медленнее, чем идентичные фрагменты в соседней дорожке.
- Причины:
  - — неодинаковое количество ДНК в разных дорожках;
  - — неодинаковые ионные условия в препаратах, внесенных в разные дорожки (присутствие примесей, влияющих электрофоретическую подвижность ДНК — солей, спирта, фенола, этидиумбромиды и др.);
  - — избыточная напряженность электрического поля;
  - — перегрев и нарушение структуры геля (избыточный ток);
  - — истощение электрофорезного буфера;
  - — микрогетерогенность геля.
- — локальные искривления молекул ДНК (А 3-6 п.н., повторяющиеся каждые 10-11 пар; ПААГ)
- В некоторых случаях сдвиг полос носит не ступенчатый, а сглаженный характер (эффект "улыбки").
- искажения электрофоретической картины поддаются математическому анализу (маркер в каждую 3-4 дорожку)



# Измерение электрофоретической подвижности фрагментов ДНК

- «На глазок» – нельзя!
- Методы:
  1. измерение обычной линейкой (малая точность, неприменим для коротких гелей)
  2. Дигитайзер (графический планшет) (анг. — digitizer), представляющий собой электронный модуль, включающий курсор-измеритель и цифровое координатное устройство.
  3. компьютеризованные регистрирующие системы, снабженные соответствующими программными средствами.



**Спасибо за внимание!**