

STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA

SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA

Je to vhodná metoda pro měření vzorků nukleových kyselin, které jsou dostatečně čisté bez významného množství kontaminant.

Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm.

Z hodnot optické hustoty lze koncentraci a čistotu vzorku stanovit podle empirických vztahů.

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

množství vcházejícího světla

množství světla propuštěného

Nejpřesnější je stanovení absorbance v rozmezí od **0,1** do **1,0**.

SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA - 2

Při stanovení koncentrace DNA platí :

ds DNA $A_{260} = 1$ odpovídá 50 $\mu\text{g/ml}$

ss DNA $A_{260} = 1$ odpovídá 33 $\mu\text{g/ml}$

Oligonukleotidy $A_{260} = 1$ odpovídá 20 $\mu\text{g/ml}$

ss RNA $A_{260} = 1$ odpovídá 40 $\mu\text{g/ml}$

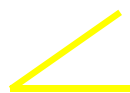
Tyto vztahy platí pro optickou dráhu 1 cm (šířka kyvety)

Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorpance při 260 a 280 nm.

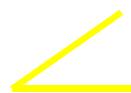
Pro DNA platí: $A_{260}/A_{280} = 1,80$ až $1,85$

Pro RNA platí: $A_{260}/A_{280} = 2$

proteiny a
aromatické
látky (fenol)



1,85



2 a více =
kontaminace
RNA

PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU DNA

- **odstranění fenolu:**

dialýza, extrakce chloroformem

- **odstranění proteinů:**

opakovaná deproteinace chloroformem. Lze použít rovněž enzymové degradace proteinů pomocí pronázy nebo proteinázy.

- **odstranění RNA:**

enzymová degradace pomocí RNázy nebo specifické precipitační postupy.

Postup měření koncentrace DNA

Plazmidovou DNA nejprve důkladně promíchejte, pak mžikovou centrifugací a nařed'te 50 × v TE pufru výsledný objem 100 μl.

Změřte jeho koncentraci na spektrofotometru Ultrospec^R2000, Pharmacia, Biotech AB a zaznamenejte.

č. vzorku	ředění	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Konc. (μg/ml)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Výtěžek DNA (μg)

Výpočet výtěžku DNA (μg)

Koncentrace DNA v neředěném vzorku: ----- μg/1000 μl

Množství DNA v 50 μl = ----- μg

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Restrikční endonukleázy (restriktázy – zkr. RE)

sekvenčně specifické endonukleázy štěpící fosfodiesterovou vazbu DNA v určité sekvenci nukleotidů (často palindromy).

Funkce: odbourávání cizorodé DNA (např. fágy).

Původ: produkty bakterií

EcoRI (*Escherichia coli*) – 37° C (kmen/serotyp)

SmaI (*Serratia marcescens*) – 25 °C

MaellI (*Methanococcus aeolicus*) – 55 °C

Typy RE: I, II,

Typ II: na dsDNA má stejné rozpoznávací místo (4 – 8 bp) s místem štěpení.

Restrikční štěpení DNA - 2

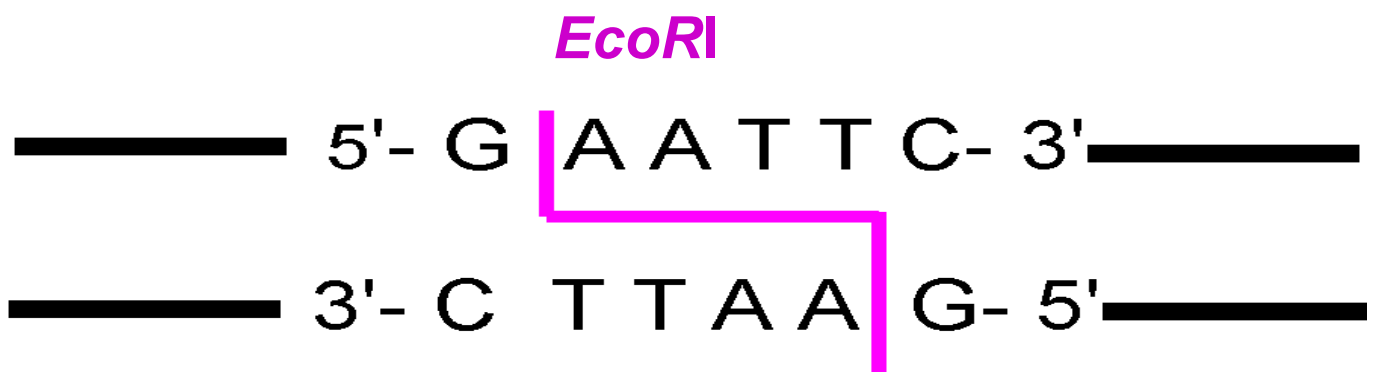
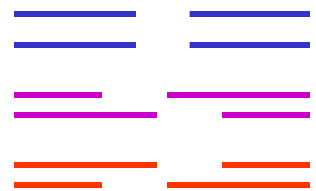
Výsledek štěpení: RE-fragmenty DNA různé velikosti

3 typy RE-fragmentů:

a) s tupými konci

b) přesahujícími 5` - konci

c) přesahujícími 3` - konci



EcoRI má relaxovanou specifitu - za neoptimálních podmínek může štěpit DNA v příbuzných sekvencích

5`GAATTC 3`

5`GGATTC 3`

5`GGATTT 3`

5`AGATTT 3`

Restrikční štěpení DNA

Jednotka enzymu = množství RE, které rozštěpí 1 μg dsDNA (obvykle DNA fága λ) za 1 hod. při optimální teplotě a optimálních podmínkách uvedených pro každou RE

IZOSCHIZOMERY – různé restriktázy se stejným rozpoznávacím místem

Klíčové faktory pro průběh reakce

Teplota

Iontová síla

Složení restričních pufrů

Pufr	NaCl	Tris.Cl (pH 7,5)	MgCl ₂
Nízká iontová síla	0	10 mM	10 mM
Střední iontová síla	50 mM	10 mM	10 mM
Vysoká iontová síla	100 mM	50 mM	10 mM

Složky restričního pufru	Výsledná koncentrace v mM (1:10 řed. pufru)				
	A	B	L	M	H
Tris acetate	33	-	-	-	-
Tris-HCL	-	10	10	10	50
Mg-acetate	10	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10
K-acetate	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
Dithioerythritol (DTE)	-	-	1	1	1
Dithiothreitol (DTT)	0,5	-	-	-	-
2-Mercaptoethanol	-	1	-	-	-
pH při 37 °C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

Pufry se uchovávají při -20 °C

Vlastnosti RESTRIKTÁZ:

**proteiny uchovávané v glycerolu při -20 °C
(stabilní)**

**důležitý faktor = teplota pro úchovu a štěpení
iontová síla (zajištěna pufrem)**

Štěpení více restriktázami

R1

R2

puf s nízkou iont silou.. puf s vyšší iont. silou

Využití restriktivního štěpení:

RE- spektra - DNA otisky, molekulární typizace

RE - fyzikální mapy

Molekulární sondy - hybridizační sondy

Klonování

Využití restriktáz

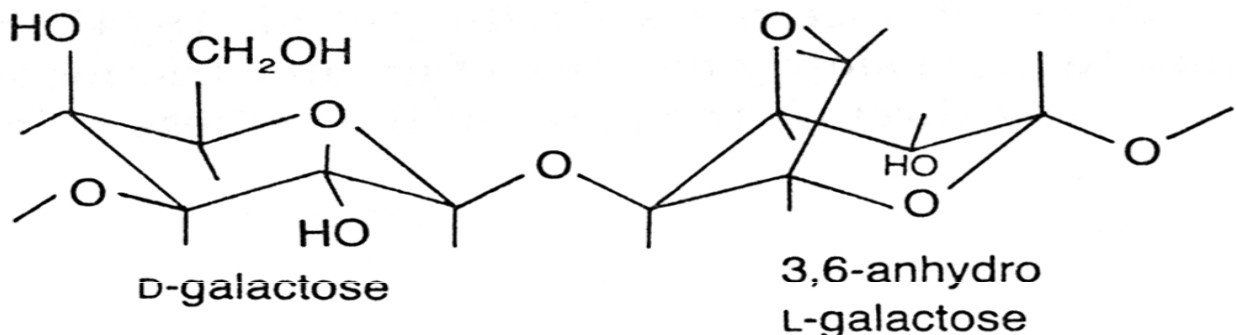
- Klonování DNA
- Detekce mutací a polymorfismů
- Stanovení příbuznosti
- Restrikční mapování (restrikční mapa)

Gelová elektroforéza - GELY

Jako nosiče se používá **agaróza** (100 – 50 000 bp)
nebo **polyakrylamid** (10 – 1 000 bp)

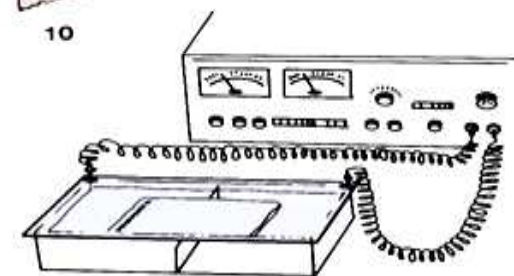
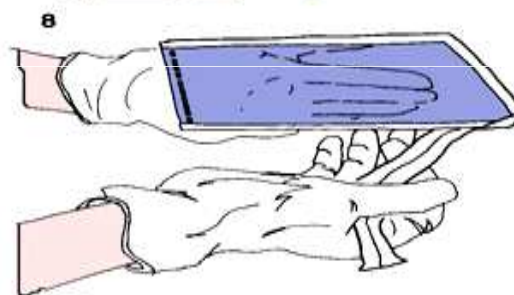
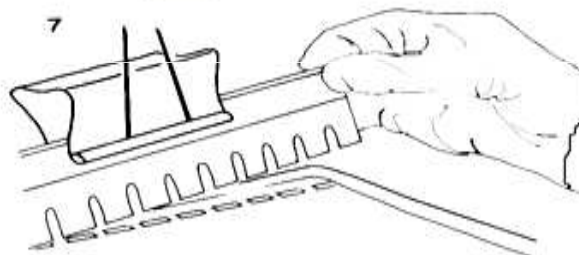
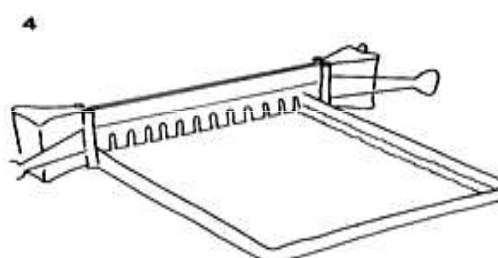
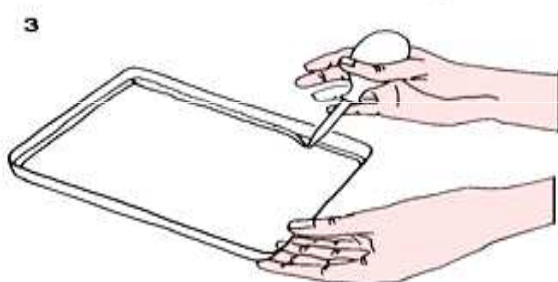
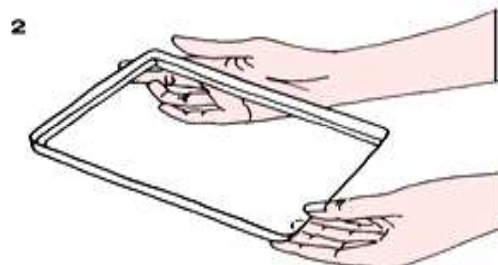
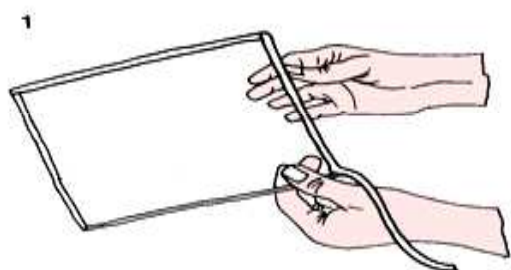
nosiče vytvářejí síťovou strukturu polymerních molekul s póry

Základní jednotka agarózy



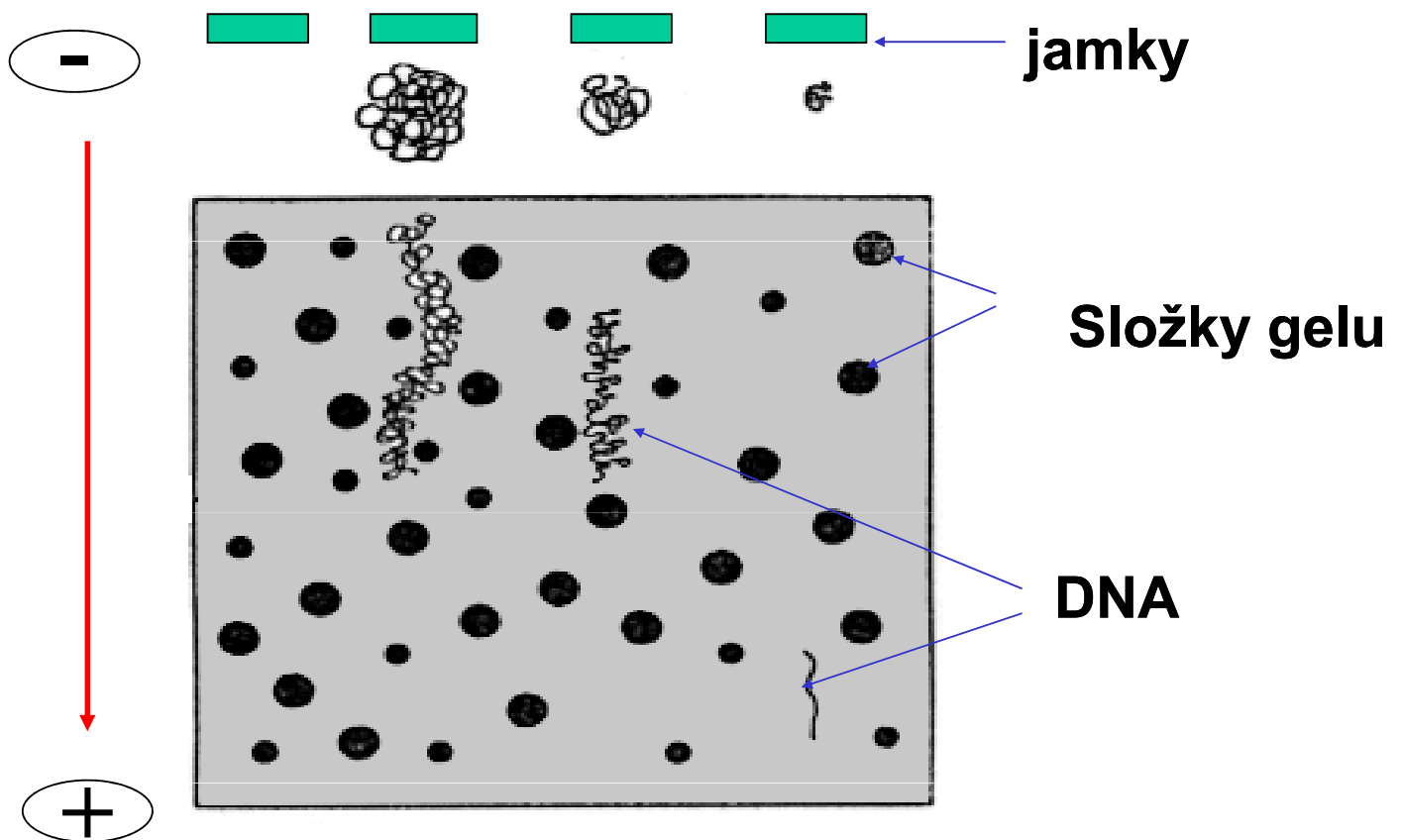
Agaróza je lineární polymer (původ z mořské řasy)
čistota je různá – purifikace
nutná je nepřítomnost endonukleáz

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA – příprava gelu



Princip ELFO

pohyb DNA s negativním nábojem v neutrálním gelu a elektroforetickém pufru v elektrickém poli k anodě



ELFO pufrý:

TRIS-acetátový (TAE): 0,04 M Tris-acetát, 0,002 M EDTA,

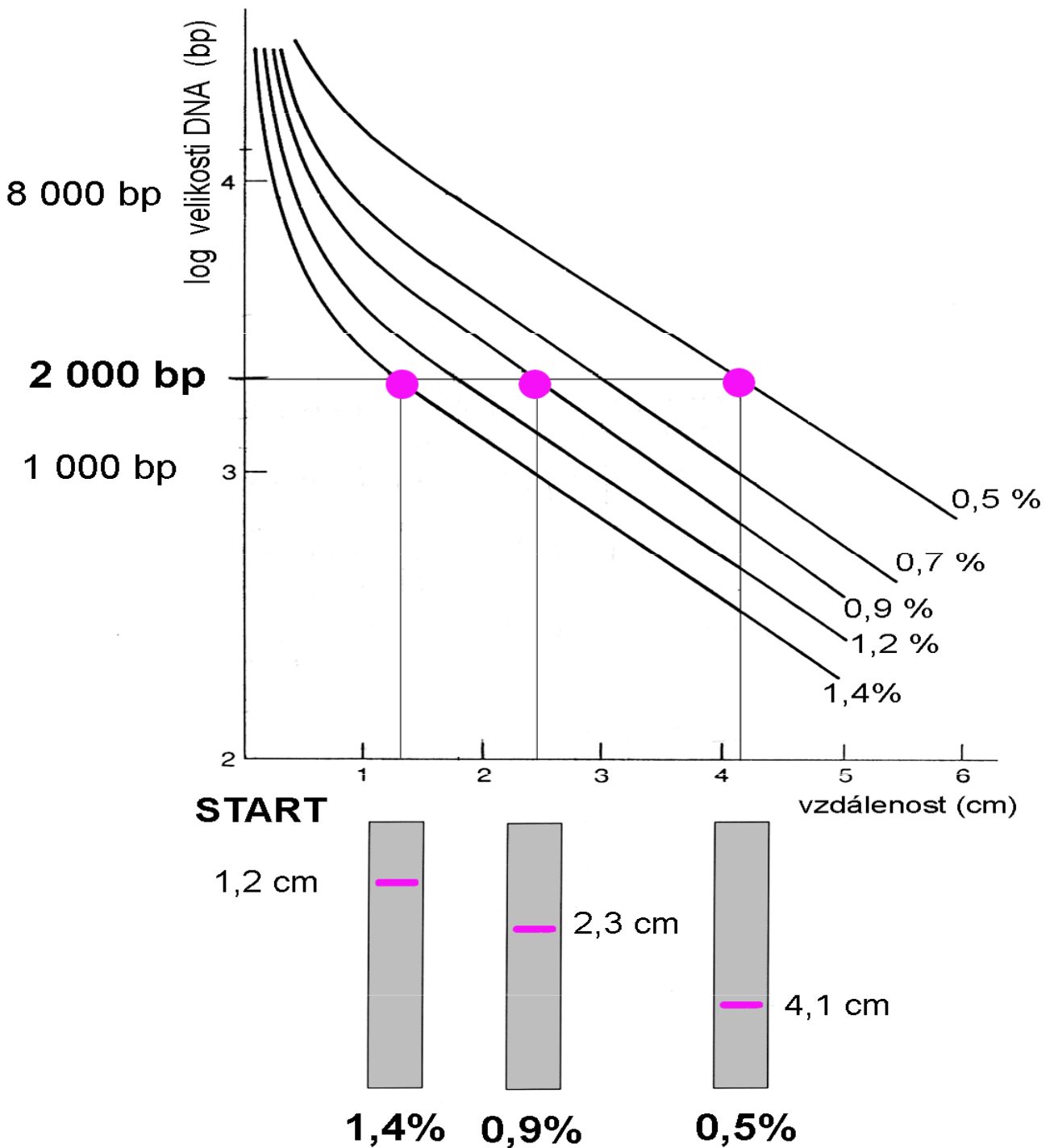
TRIS-fosfátový (TPE): 0,08 M Tris-fosfát, 0,008 M EDTA

TRIS-borátový (TBE): 0,089 M Tris-borát, 0,089 M kyselina boritá, 0,002 M EDTA

Faktory ovlivňující rychlost migrace v gelu

- Konformace DNA
- Složení elektroforetických pufrů (iontová síla-TAE a TBE)
- Složení bazí a teplota (u PAGE)
- Přítomnost interkalačních barviv
- Směr elektrického pole (PFGE > 50 kb)
- Napětí (5V/cm)
- Koncentrace gelu
- Velikost DNA

Pohyb fragmentů DNA v gelu a jejich separace



**Separace DNA fragmentů v gelu
v závislosti na koncentraci agarózy**

koncentrace agarózy (%)	rozsah dělení dsDNA (kb)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 4
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Nanášecí (barvicí pufr) 6×koncentrovaný:

0,25% bromfenolová modř; 40% (w/v) sacharóza ve vodě. Existuje několik typů nanášecích pufrů, které mohou obsahovat místo sacharózy glycerol nebo Ficoll 400.

	0,5 – 1,4 % agaróza	4 % polyakrylamid	6 % polyakrylamid
Xylencyanol	4 kb	170 bp	105 bp
Bromfenolová modř	300 bp	40 bp	25 bp
Oranž G	50 bp	-	-
Bromkresolová zeleň	Pouze pro alkalickou agarózovou elektroforézu 100 bp		

Metody detekce

- Interkalační barviva (ethidium bromid)
- Indolová a imidazolová barviva (DAPI)
- Stříbro
- Kyaninová barviva (SYBR Gold, SYBR Green)
- Radioaktivní značení NK

Ethidium bromid

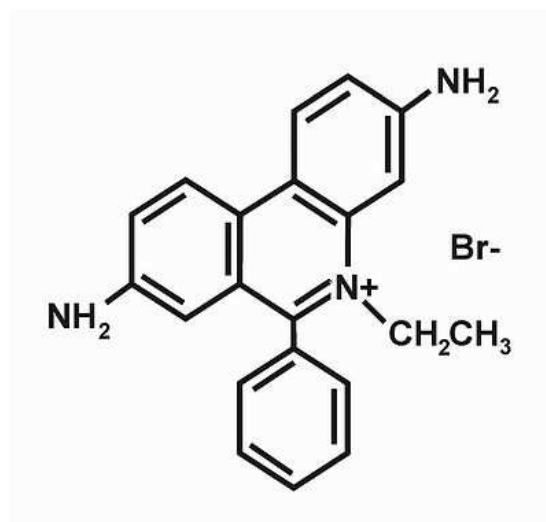
Mutagen a karcinogen

Interkalace do dsDNA (vazba i na helixy ssDNA a RNA)

Po interkalaci – 20-30x větší fluorescence (fixní pozice v DNA)

Transiluminátor (UV ~ 302 nm), EtBr-DNA emise 590 nm

Citlivost 1-5 ng



Postup přípravy gelu pro ELFO a nanášení vzorků

- 1. Vypočítat objem gelu podle velikosti tvořítka**
- 2. Připravit 1×TAE pufr ze zásob. roztoku konc. 50×**
- 3. Navážit agarózu a smíchat s 1×TAE pufrem, tak aby vznikl 1% gel**
- 4. Rozvařit agarózu 10 min/100 °C**
- 5. Opatrně promíchat a vytemperovat na 50 °C**
- 6. Nalít do tvořítka, tak, aby nevznikly bubliny a výška gelu odpovídala 5 mm**
- 7. Nechat gel utuhnout (20 - 30 min)**
- 8. Přelít gel 1 × konc. TAE pufrem**
- 9. Opatrně vysunout hřeben z gelu**
- 10. Nanášet vzorky (12 ml) do kterých byl přidán nanášecí pufr**
- 11. Provést elektroforézu**

Plazmid pUC18 -2,69 kbp

