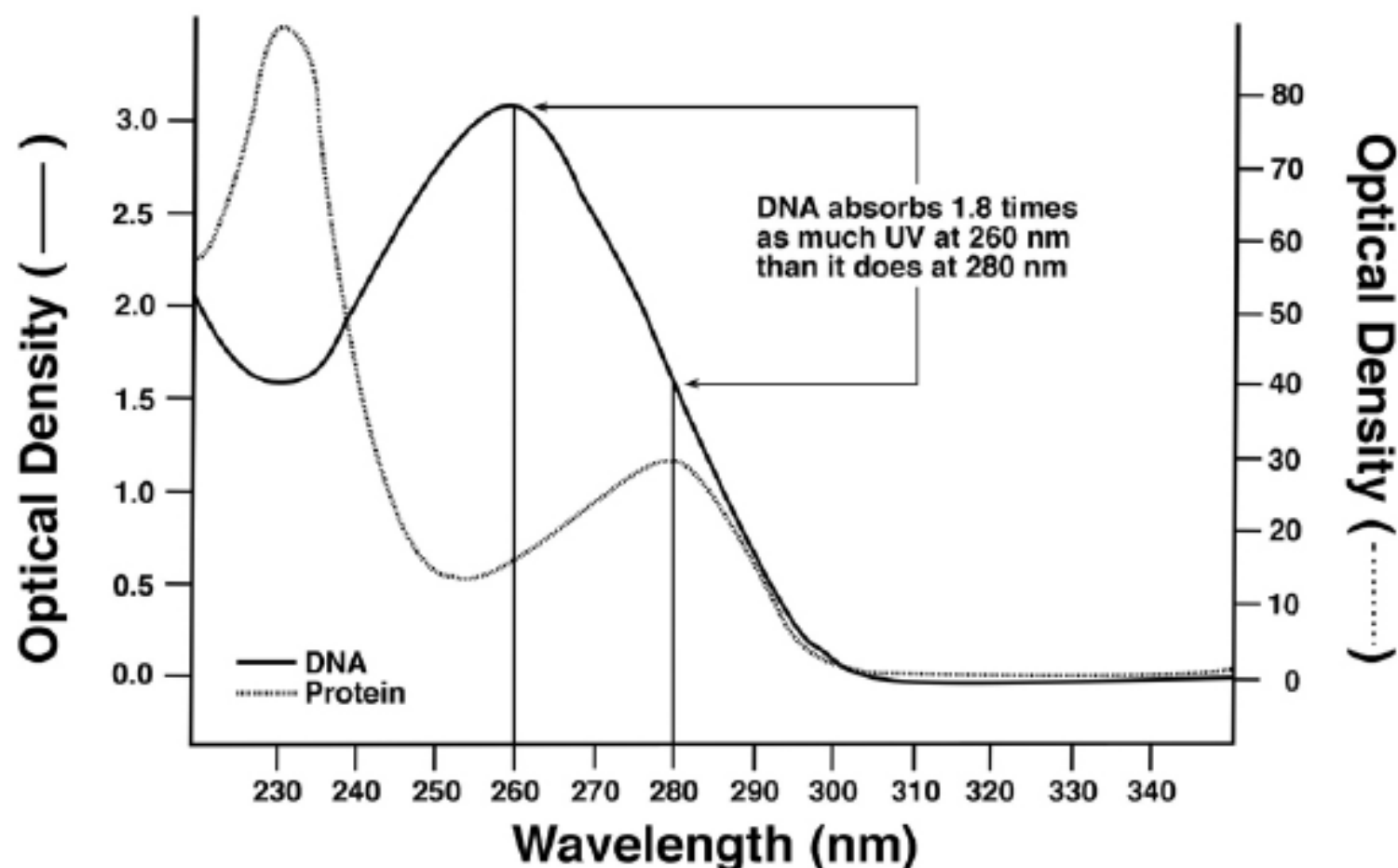


- Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je založeno na poznatku, že roztoky DNA pohlcují UV záření.
- Záření je pohlcováno pyrimidinovými a purinovými bázemi DNA. Dochází k excitaci jejich chemických vazeb, což má za následek postupnou degradaci DNA. Absorpční maxima jednotlivých nukleotidů se navzájem poněkud liší: dATP ... 259 nm, dCTP ... 271 nm, dGTP ... 253 nm, dTTP ... 267 nm. DNA absorbuje maximálně UV záření o vlnové délce 260 nm.
- Množství pohlceného UV záření je přímo úměrné koncentraci DNA v roztoku a vyjadřuje se hodnotami absorbance
- Bez problémů pro roztoky čisté DNA
- Při izolaci DNA – kontaminace proteiny, aromatické aminokyseliny také absorbují v UV oblasti
- Kontaminaci RNA nejsme schopni obvykle pomocí UV spektrofotometrie odlišit (agarózová elektroforéza)

- Výhodou spektrofotometrického stanovení je jeho přesnost a současná možnost posoudit čistotu preparátu. Čistotu DNA lze stanovit z poměrů absorbancí při různých vlnových délkách. Pro čistou DNA platí tyto hodnoty:
  - $A_{280}/A_{260} = 0,550$                        $A_{260}/A_{280} = 1,8$  až  $1,9$
  - $A_{230}/A_{260} = 0,455$                        $A_{260}/A_{230} = 2,20$
- Stupeň znečištění DNA lze posoudit rovněž proměřením absorbance vzorku v rozsahu vlnových délek 230 - 300 nm a vyhodnocením získané křivky.



# STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA

## SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA

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

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  $\mu\text{g/ml}$

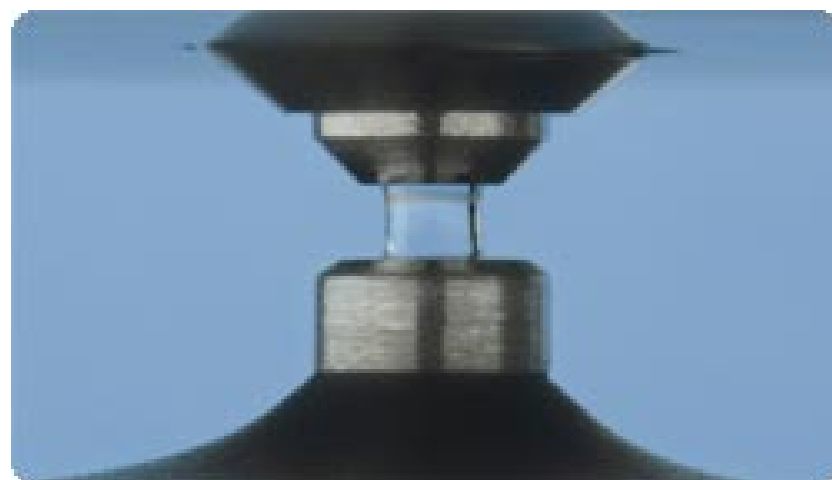
**ss DNA**                     $A_{260} = 1$     odpovídá 33  $\mu\text{g/ml}$

**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)**



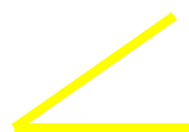


**Stupeň čistoty** nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při 260 a 280 nm.

Pro **DNA** platí:  $A_{260}/A_{280} = 1,80$  až  $1,90$

Pro **RNA** platí:  $A_{260}/A_{280} = 1,90$  až  $2,1$

proteiny a  
aromatické  
látky (fenol)



**1,85**



2 a více =  
masivní  
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. Přechištění na chromatografických kolonkách.

- **odstranění RNA:**

enzymová degradace pomocí RNázy

# Alternativní metody

- Využití flouroforů, které se váží na DNA a intenzita jejich fluorescence je úměrná koncentraci DNA – vysoká citlivost
- Využití v např. v lyzátech buněk (silné znečištění proteiny – vazba na DNA musí být specifická)
- př. Hoechst 33342, ethidium bromid, PicoGreen, ...
- Měříme proti nějakému standardu o známé koncentraci

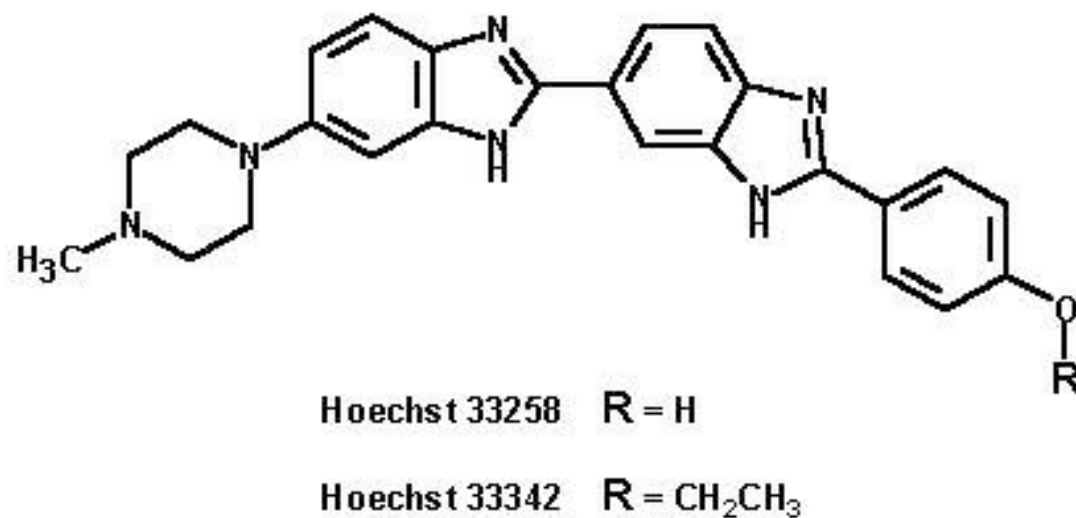


Figure 1. Chemical structure of Hoechst 33258 and Hoechst 33342 used in this study

- Necitlivé na znečištění ale zároveň nás na znečištění neupozorní

# Postup měření koncentrace DNA

Plazmidovou DNA nejprve důkladně promíchejte, a naředte  $5 \times$  v TE pufru - výsledný objem  $10 \mu\text{l}$

Změřte jeho koncentraci na Nanodropu (objem  $2 \mu\text{l}$ )

**Určete koncentraci a čistotu DNA v původním neředěném vzorku**



# Enzymy, jejichž substrátem jsou NK

## A. Podle typu substrátu

- DNA enzymy
- RNA enzymy

## B. Podle typu reakce

- enzymy syntetizující NK (anaboličké) = polymerázy
- enzymy odbourávající NK (kataboličké) = nukleázy
- enzymy modifikující NK
- enzymy spojující molekuly NK = ligázy

# DNA Nukleázy

rozkládaná molekula	typ degradace	název enzymové třídy	specifita	Příklad	zdrojový organismus
DNA	od konců	Exonukleázy	ss	Exonukleáza III	<i>E. coli</i>
			ds	Bal 31	<i>Alteromonas espejiani</i>
	uvnitř molekuly	Endonukleázy	ss	S1 nukleáza	<i>Aspergillus oryzae</i>
			ds	restrikční endonukleázy	bakterie
				DNáza I	Hovězí pankreas

# Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

## Restrikční endonukleázy (restriktázy – zkr. RE)

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

Původ: produkty bakterií

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

*SmaI* (*Serratia marcescens*) – 25 °C

*MaeIII* (*Methanococcus aeolicus*) – 55 °C

Funkce: odbourávání cizorodé DNA (např. fágy).

- vlastní DNA chráněna metylací

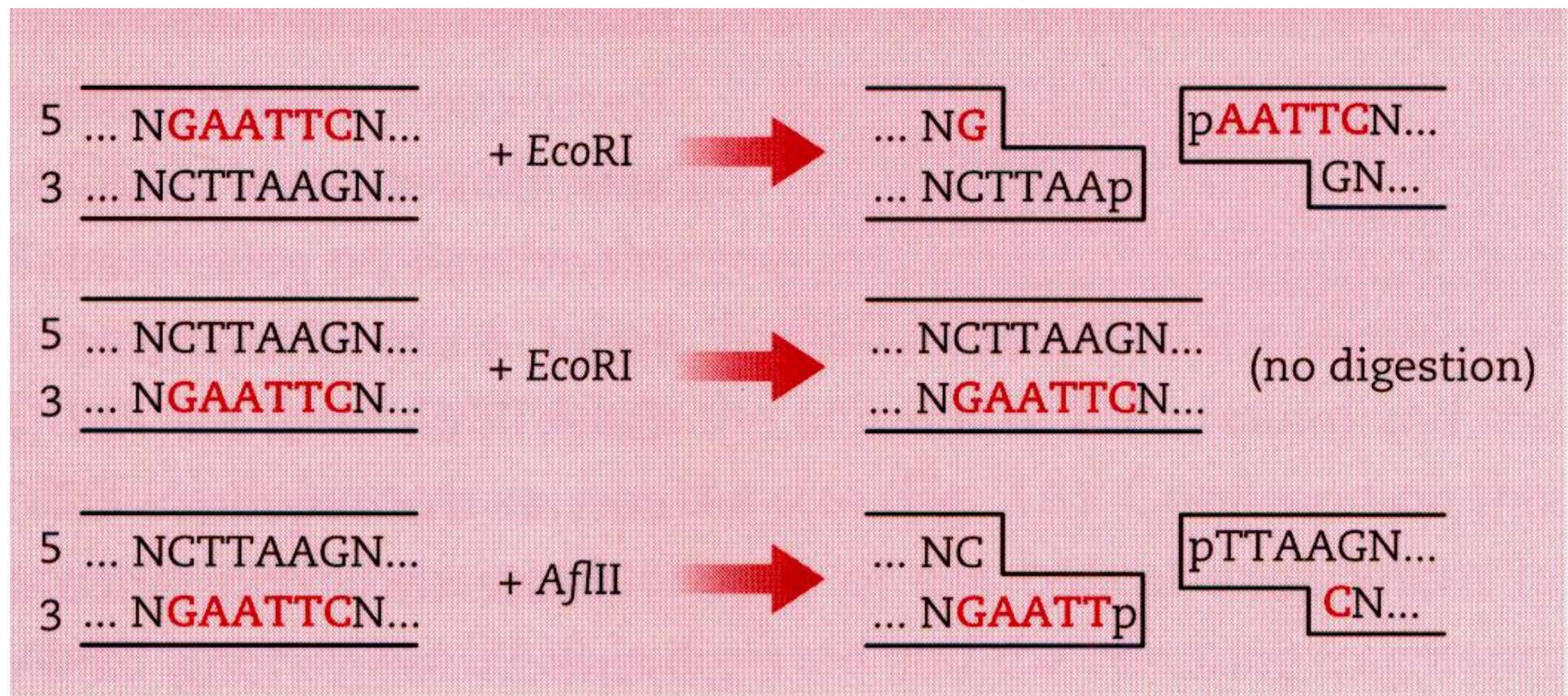
Typy RE: I, II, ....

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

## EcoRI



Orientace je důležitá



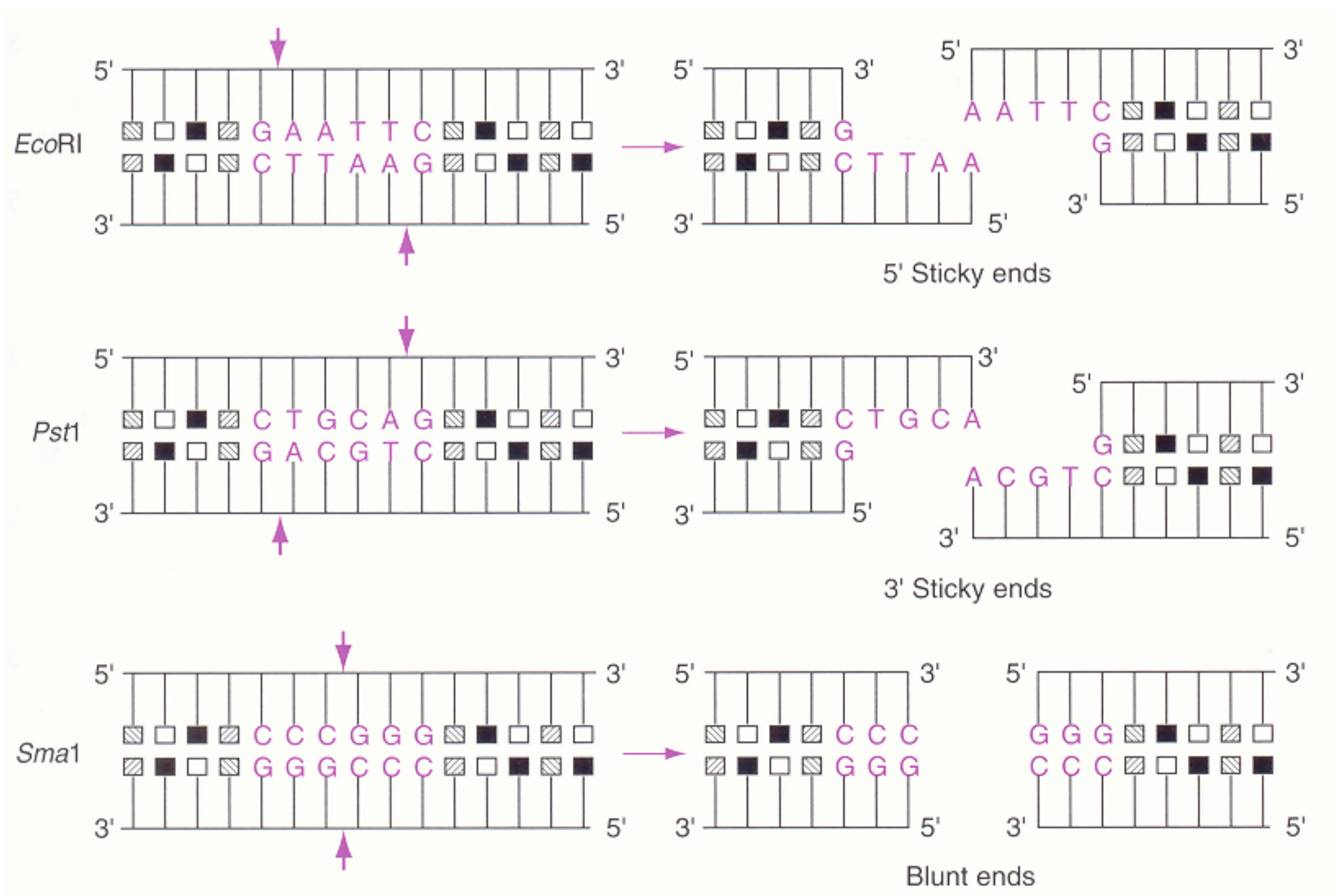
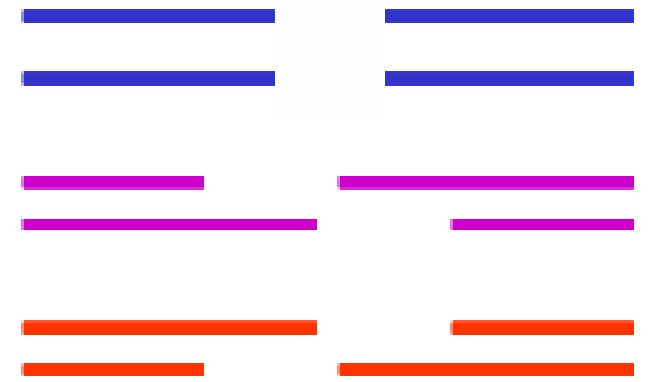
**EcoRI** má relaxovanou specifitu - za neoptimálních podmínek může štěpit DNA v příbuzných sekvencích (HF – high fidelity mutanti)

5` GAATTC 3`  
5` GGATTC 3`  
5` GGATTT 3`  
5` AGATTT 3`



### 3 typy RE-fragmentů:

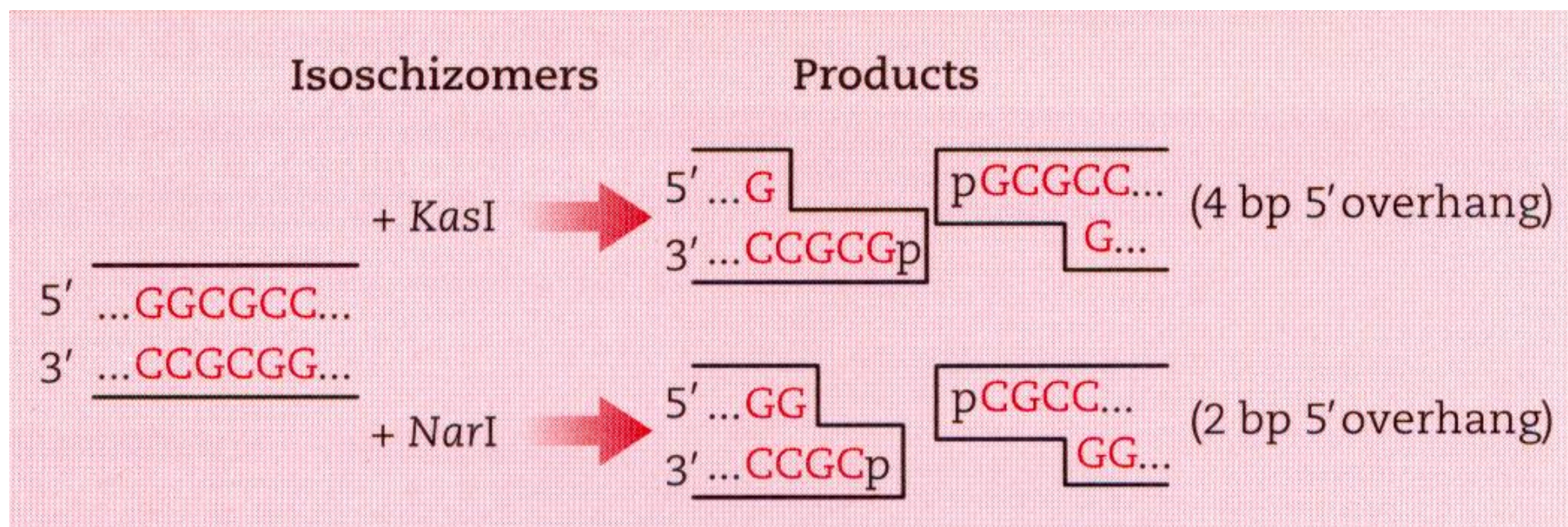
- a) s tupými konci
- b) přesahujícími 5` - konci
- c) přesahujícími 3` - konci



# Restrikční štěpení DNA

Jednotka enzymu = množství RE, které rozštěpí 1 mg dsDNA (obvykle DNA fága I) 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

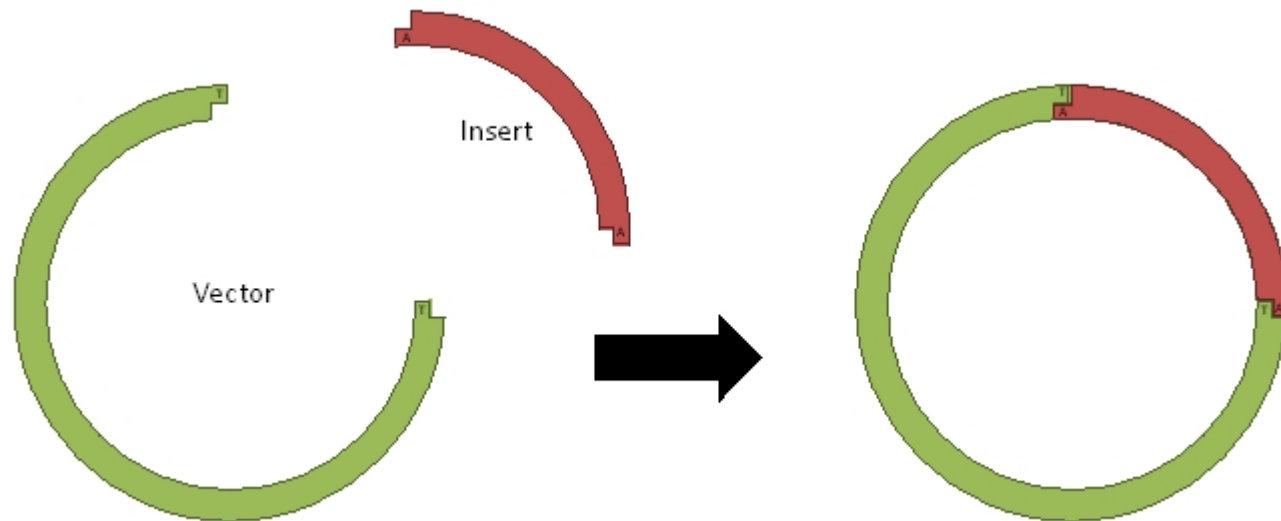
Pufř	NaCl	Tris.Cl (pH 7,5)	MgCl <sub>2</sub>
Nízká iontová síla	0	10 mM	10 mM
Střední iontová síla	50 mM	10 mM	10 mM
Vysoká iontová síla	100 mM	50 mM	10 mM

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 <sub>2</sub>	-	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 a enzymy se uchovávají při -20 °C**

**Pracujeme s nimi na ledu**

# Štěpení více restriktázami



**R1** i **R2** ve stejném pufru

**R1**

pufr s nízkou iont silou..

**R2**

pufr s vyšší iont. silou

**Využití restriktčního štěpení:**

**RE- spektra - DNA otisky - stanovení příbuznosti**

**Restriktční mapování**

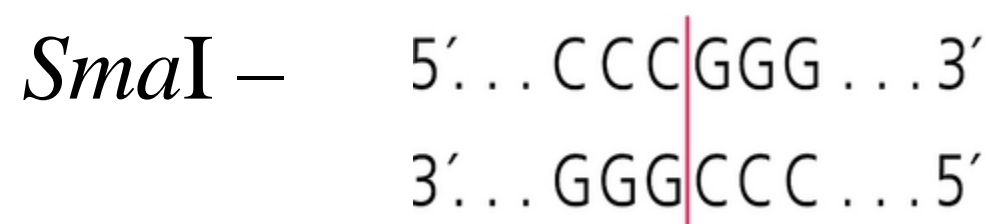
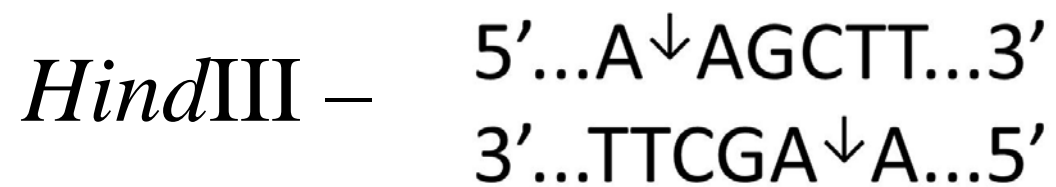
**Příprava molekulárních sond - hybridizační sondy**

**Klonování DNA**

**Detekce mutací a polymorfismů**



# Úloha 3



Reakční směs (20 ul):	voda	? ul
	10x pufr	2 ul
	DNA	1ug
	enzym	5U