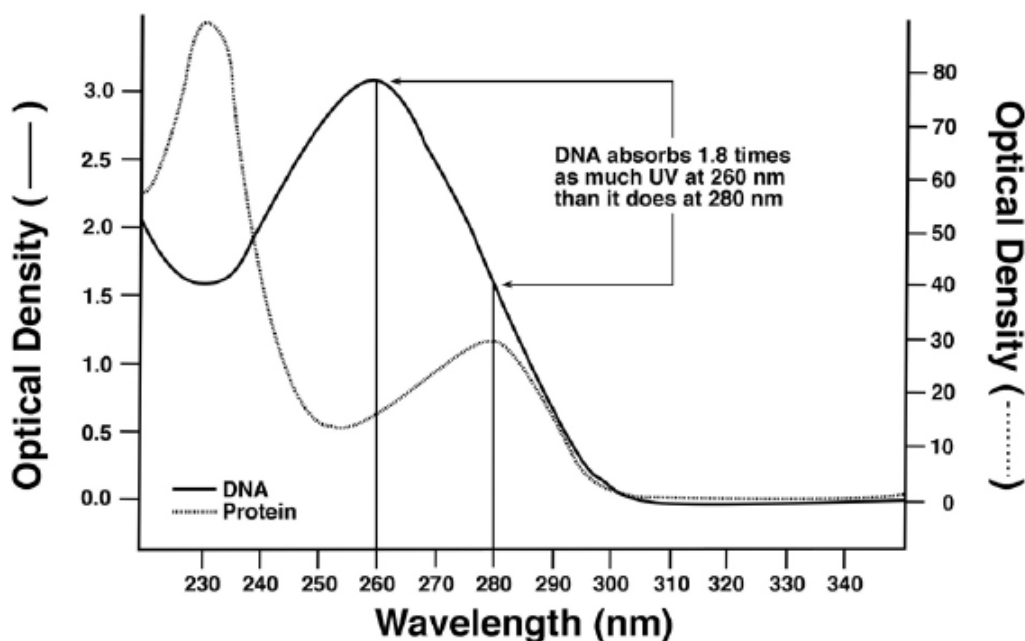


- Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je založeno na poznatku, že roztoky DNA pohlcují UV záření.
- Záření je pohlcováno pyrimidinovými a purinovými bázemi DNA. Dochází k excitaci jejich chemických vazeb, což má za následek postupnou degradaci DNA. Absorpční maxima jednotlivých nukleotidů se 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 stanovení koncentrace 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 $\mu\text{g/ml}$

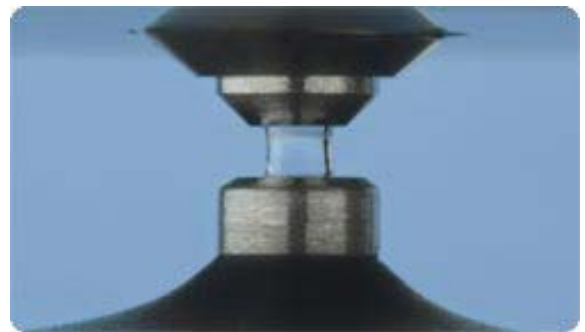
ss DNA $A_{260} = 1$ odpovídá 33 $\mu\text{g/ml}$

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 $1,90$

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

proteiny a
aromatické
látky (fenol)

\angle **1,85** \angle

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 flouoroforů, 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

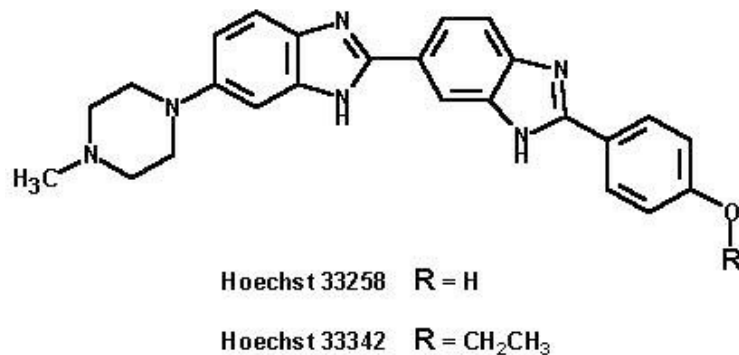
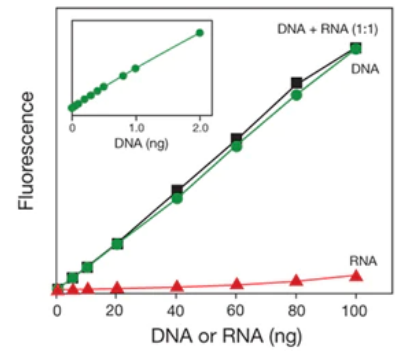


Figure 1. Chemical structure of Hoechst 33258 and Hoechst 33342 used in this study

- Necitlivé na znečištění ale zároveň nás na znečištění neupozorní

Qubit



Specifické fluorescenční sondy pro měření – DNA
- RNA
- proteinů

Postup měření koncentrace DNA

Plazmidovou DNA nejprve důkladně promíchejte, a naředte 5 × v TE pufru - výsledný objem 10 μl

Změřte jeho koncentraci na Nanodropu (objem 2 ul)

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 (anabolické) = polymerázy
- enzymy odbourávající NK (katabolické) = 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 restričními endonukleázami

Restriční 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)

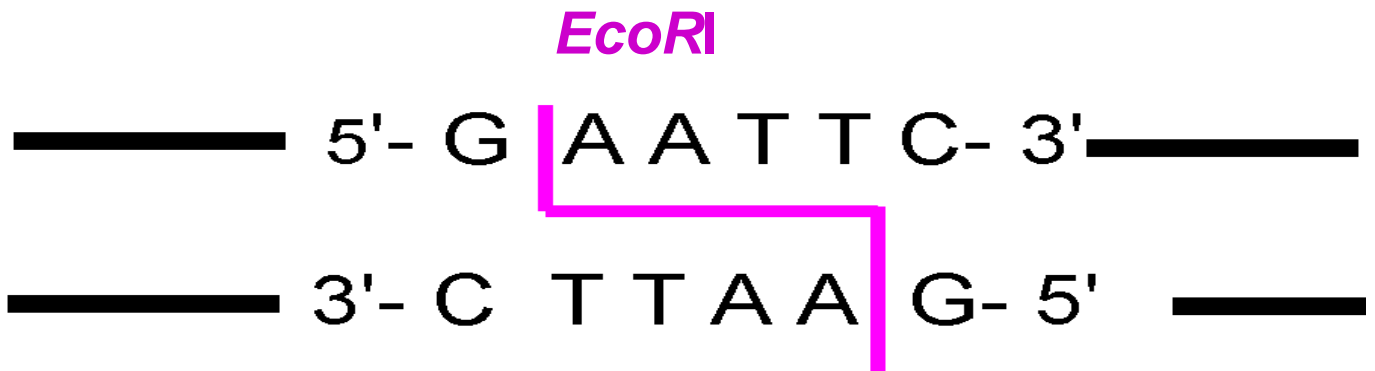
SmaI (*Serratia marcescens*) – 25 °C

MaeIII (*Methanococcus aeolicus*) – 55 °C

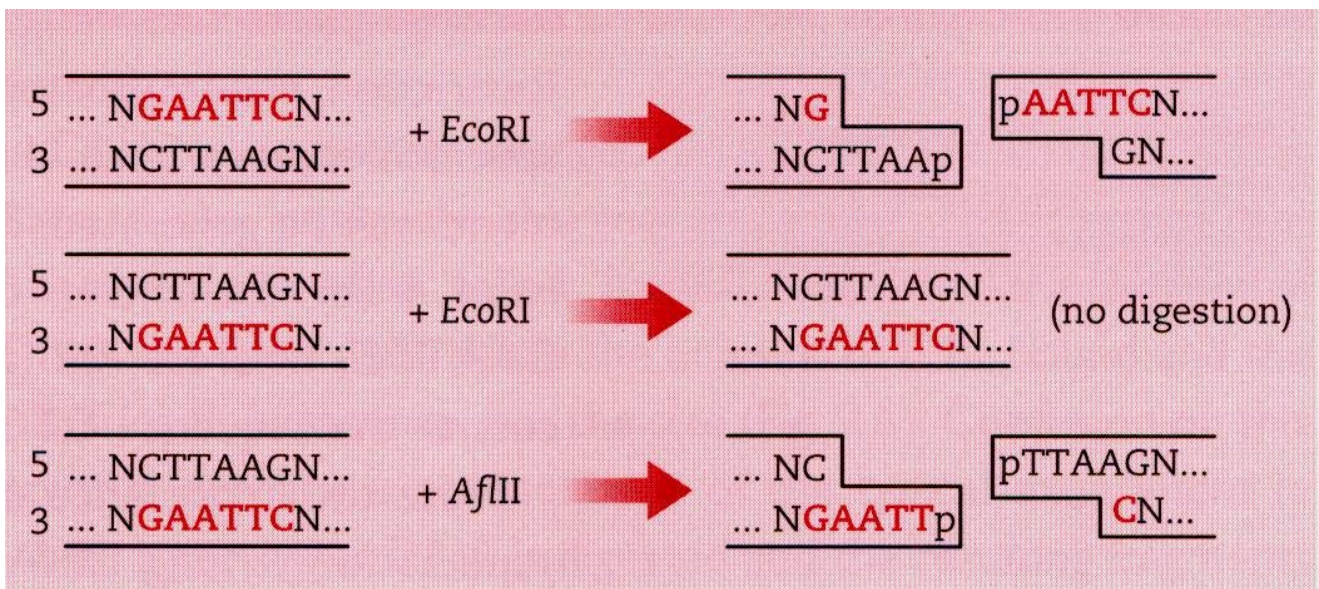
Funkce: odbourávání cizorodé DNA (fágy, plazmidy).

Typy RE: I, II,

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



Orientace je důležitá



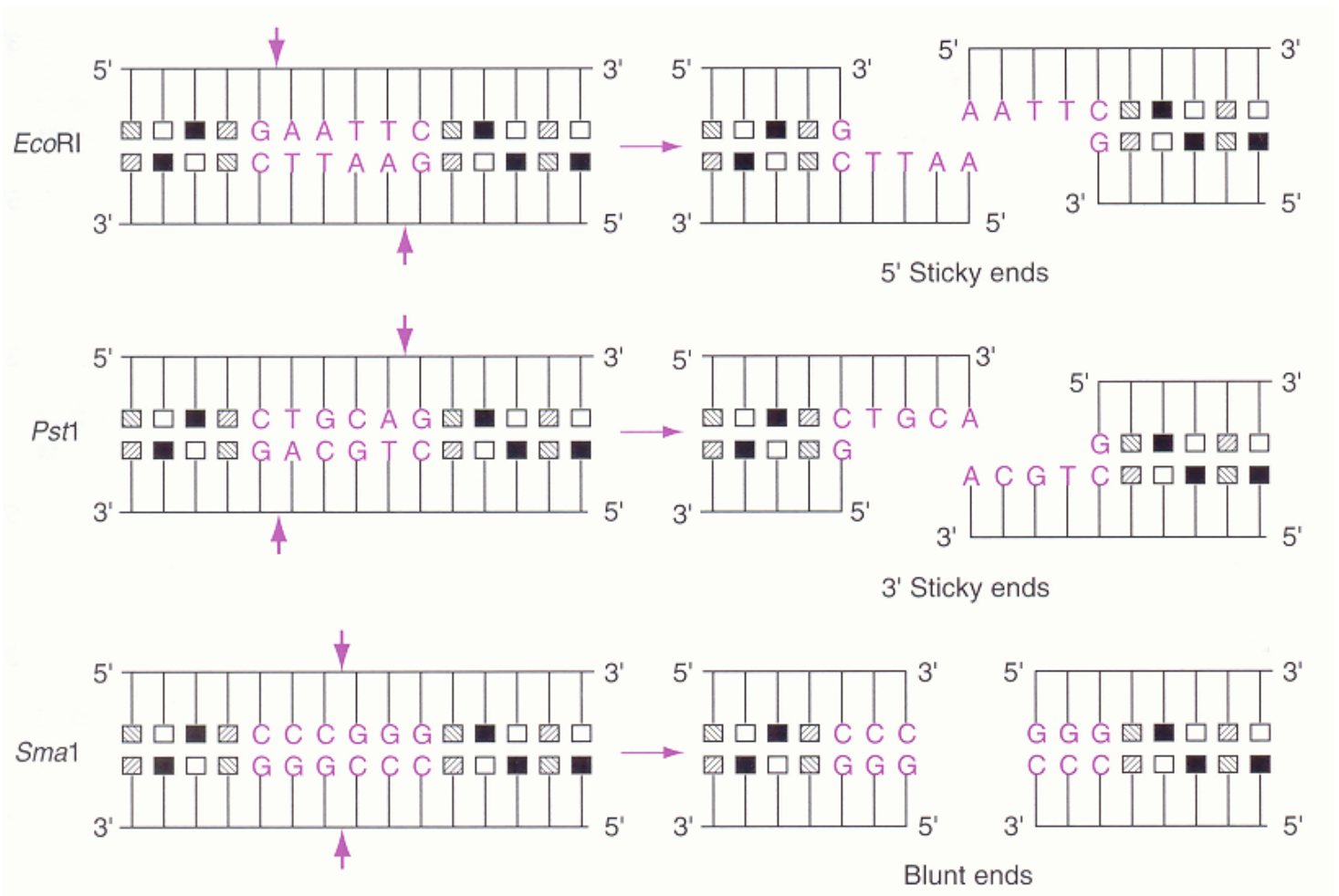
EcoRI má relaxovanou specifitu - za neoptimálních podmínek může štěpit DNA v příbuzných sekvencích

(HF – high fidelity mutanti)

- 5` **GAATTC** 3`
- 5` **GGATTC** 3`
- 5` **GGATT** 3`
- 5` **AGATT** 3`

3 typy RE-fragmentů:

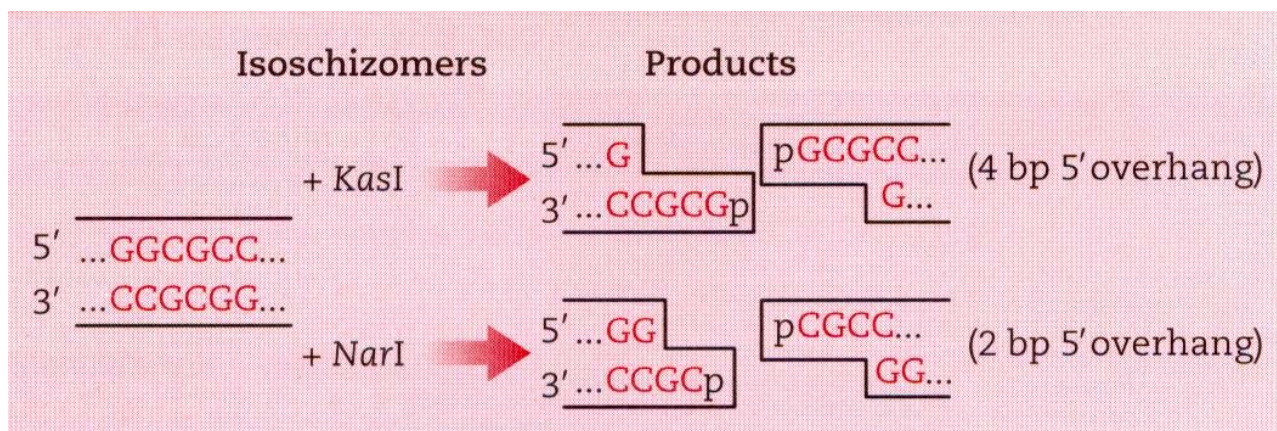
- a) s tupými konci
- b) přesahujícími 5` - konci
- c) přesahujícími 3` - konci



Restrikční štěpení DNA

Jednotka enzymu = množství RE, které rozštěpí 1 ug dsDNA (obvykle DNA fága lambda) 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

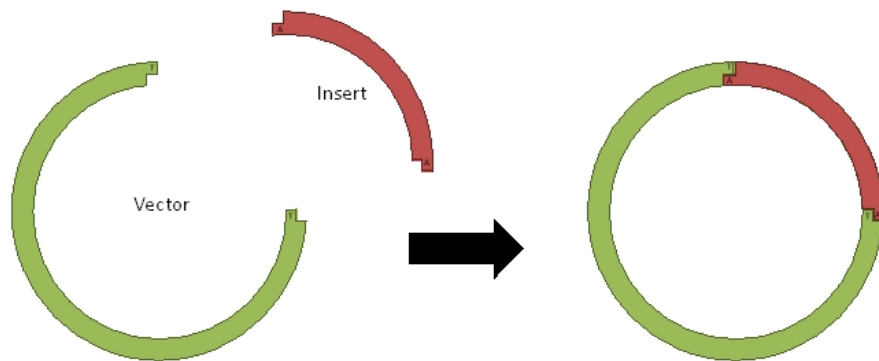
Pufry a enzymy se uchovávají při -20 °C

Pracujeme s nimi na ledu

System pufřů od NEB

NEBuffer 1.1
yellow label
10 mM Bis Tris Propane-HCl
10 mM MgCl ₂
100 µg/ml BSA
pH 7.0 @ 25°C
NEBuffer 2.1
blue label
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl ₂
50 mM NaCl
100 µg/ml BSA
pH 7.9 @ 25°C
NEBuffer 3.1
red label
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl ₂
100 mM NaCl
100 µg/ml BSA
pH 7.9 @ 25°C
CutSmart Buffer
green label
20 mM Tris-acetate
10 mM Magnesium acetate
50 mM Potassium acetate
100 µg/ml BSA
pH 7.9 @ 25°C

Štěpení více restriktázami



R1 i **R2** ve stejném pufru

R1

pufr s nízkou iont silou..

R2

pufr s vyšší iont. silou

Využití restriktivního štěpení:

Klonování DNA

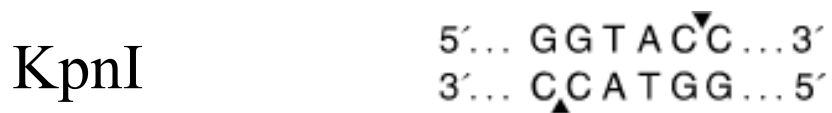
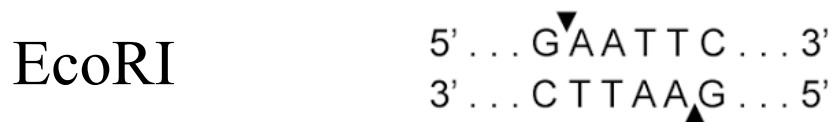
Detekce mutací a polymorfismů

RE- spektra - DNA otisky - stanovení příbuznosti

Restriktivní mapování

Příprava molekulárních sond - hybridizační sondy

Úloha 3



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