

jméno:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)	

přílohy protokolu: graf: kalibrační přímka pro fotometrické stanovení DNA v UV oblasti

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Primární struktura nukleových kyselin. Sekundární struktura nukleových kyselin. Denaturace nukleových kyselin. Absorbující složky nukleových kyselin, absorpční spektrum nukleových kyselin. Lambertův-Beerův zákon. Chemické výpočty.

Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).

Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen části A, B.

Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): jen části A, B, C.

PRINCIP ÚLOHY

A. Izolace deoxyribonukleové kyseliny

Nukleové kyseliny se v buňkách často vyskytují ve formě komplexů s proteiny (např. nukleozomy). Podstatou izolace jaderné deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je dezintegrace komplexu DNA-protein a izolace čisté nerozštěpené DNA bez příměsí ribonukleové kyseliny a proteinů.

Prvním krokem při izolaci nukleových kyselin je důkladná lyze buněk a tkání s následnou šetrnou homogenizací. Poté se provádí dezintegrace komplexů DNA-protein pomocí detergentu (nejčastěji se jedná o dodecylsírán sodný – SDS) v přítomnosti enzymů, které napomáhají degradaci proteinů. Následuje oddělení denaturovaných proteinů od nukleových kyselin pomocí extrakce organickým činidlem. Mezi často používaná činidla patří fenol, který současně inhibuje nukleasy, nebo směs fenol-chloroform (1:1), popřípadě směs chloroformu a isoamylalkoholu. Posledním krokem je srážení molekul DNA z vodné fáze pomocí organického rozpouštědla (např. isopropanol, ethanol).

V této části úlohy bude provedena extrakce nukleoproteinového komplexu z bakteriálních buněk v přítomnosti dodecylsíránu sodného, deproteinace produktu chloroformem a vysrážení nukleové kyseliny z vodného roztoku ethanolem.

B. Identifikace DNA obsažené ve vzorku specifickou barevnou reakcí

V kyselém prostředí hydrolyzují nukleové kyseliny na směs nukleotidů a nukleosidů (hydrolyza fosfodiesterových vazeb), z nichž zejména purinové nukleotidy a nukleosidy dále snadno odštěpují cukernou složku (hydrolyza N-glykosidické vazby spojující cukernou složku s bází). RNA obsahuje jako cukernou složku ribosu, DNA 2'-deoxyribosu. Ribosu a 2'-deoxyribosu lze navzájem odlišit na základě rozdílného zbarvení, které tyto sacharidy poskytují při reakci s difenylaminem po mineralizaci koncentrovanou kyselinou.

C. Stanovení čistoty DNA spektrofotometrií v UV oblasti, denaturace DNA

Aromatické heterocykly bází nukleových kyselin absorbují UV záření s maximem v okolí vlnové délky 260 nm. Jestliže se nukleové kyseliny nacházejí ve směsi s proteiny, je tvar charakteristického absorpčního spektra nukleových kyselin (s maximem při vlnové délce 260 nm) přítomností proteinů zkreslen, neboť i proteiny absorbují UV záření v této oblasti vlnových délek. Přítomnost nukleových

kyselin se však i ve spektru vzorku obsahujícího větší množství proteinů projevuje nezřetelným absorpčním maximem nebo alespoň prodlevou v okolí vlnové délky 260 nm.

Čistotu nukleové kyseliny ve vzorku vyjadřují dva základní poměry absorbancí, a to poměr A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Poměr A_{260}/A_{280} udává míru kontaminace izolované nukleové kyseliny proteiny. Pro čistou DNA by měl být poměr 1,7-1,9 a pro čistou RNA 1,8-2,0. Poměr A_{260}/A_{230} udává míru znečištění nukleové kyseliny nízkomolekulárními látkami (fenol, EDTA, huminové kyseliny, atd.) a rovněž proteiny (absorbance peptidové vazby). Pro čistou nukleovou kyselinu by měl být poměr vyšší než 1,5.

Postup izolace DNA by měl být natolik šetrný, aby nedocházelo k její **denaturaci** (rozpadu nativní dvou řetězové struktury). Sekundární struktura nukleové kyseliny silně ovlivňuje absorpci UV záření - u dvou řetězových nukleových kyselin (tzn. především DNA) jsou heterocyklická jádra bází pravidelně uspořádána uvnitř dvoušroubovice a takto uspořádaná struktura absorbuje méně než neuspořádaná jedno řetězová struktura (kromě většiny RNA se jako jedno řetězová vyskytuje denaturovaná DNA). Při rozpadu dvoušroubovice a vzniku nahodilého uspořádání dochází ke vzrůstu absorbance při vlnové délce 260 nm. Pomocí denaturace (nejčastěji tepelné denaturace – zahřátím vzorku DNA na vyšší teplotu a jeho následným rychlým ochlazením) lze zjistit, zda má izolovaný vzorek vlastnosti nativní DNA.

D. Stanovení koncentrace DNA měřením absorbance v UV oblasti

Schopnosti nukleových kyselin absorbovat UV záření s absorpčním maximem **při vlnové délce kolem 260 nm** lze využít k jejich **kvantitativnímu stanovení**. V praxi se využívá empiricky zjištěného vztahu, kdy u nativní (dvou řetězové) DNA $A_{260} = 1,0$ odpovídá koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ a u denaturované (jednořetězové) DNA a RNA $A_{260} = 1,0$ odpovídá koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Izolace DNA

Materiál a vybavení:

bakteriální buňky (1g vlhkého peletu)
roztok EDTA-NaCl (0,15 mol.l⁻¹ EDTA + 0,1 mol.l⁻¹ NaCl, pH 8,0)
roztok lysozymu (10 mg.ml⁻¹)
25% roztok sodiumdodecylsulfátu (SDS)
5 mol.l⁻¹ chloristan sodný
směs chloroform - isoamylalkohol (24:1)
95% ethanol
fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

pipety, dávkovače, termostat, odměrné válce, centrifuga, centrifugační kyvety, vortex, zkumavka, ledová lázeň

Postup:

K peletu bakteriálních buněk v centrifugační zkumavce přidejte 1 ml roztoku EDTA-NaCl, rozmíchejte na vortexu. K suspenzi připipetujte 2 ml roztoku EDTA-NaCl, 130 ul roztoku lysozymu a směs inkubujte 15 min. při 37 °C (každých 5 minut promíchejte). Ke směsi přidejte 260 ul 25% roztoku SDS, opatrně promíchejte a inkubujte při 60 °C po dobu 10 minut (každé 2 minuty směs promíchejte). Míchejte opatrně, abyste zabránili nadměrnému pění. Uvolnění nukleové kyseliny z buněk se projeví zvýšením viskozity roztoku a zákalem.

Poté směs zchladte na okolní teplotu pod tekoucí studenou vodou, přidejte 1,2 ml 5 mol.l⁻¹ chloristanu sodného, promíchejte a v digestoři ke směsi přidejte 5,4 ml směsi chloroform - isoamylalkohol (24:1). Obsah zkumavky důkladně promíchejte a centrifugujte 20 minut při 9000 ot/min.

Po centrifugaci se vytvoří tři vrstvy (spodní organická, střední s denaturovanými proteiny a horní vodná obsahující nukleové kyseliny). V digestoři opatrně odeberte (Pasteurovou pipetou nebo dávkovačem) horní vodnou vrstvu do nové 15 ml centrifugační zkumavky a nukleovou kyselinu vysrážejte přidáním dvojnásobného objemu 95% ethanolu. Směs opatrně promíchejte převrácením zkumavky, během kterého uvidíte srážející se vlákna nukleové kyseliny. Poté směs centrifugujte 10 minut při 9000 ot/min. Odlijte supernatant, zkumavku obraťte na tampón buničiny a nechte vytéci veškerý roztok. Pelet rozpustěte v 0,5 ml fyziologického roztoku. Odeberte 50 ul rozpuštěného peletu a přidejte k němu 2 ml fyziologického roztoku. Tento vzorek uschovejte v ledové lázni pro použití v části C úlohy. Zbytek rozpuštěného peletu (cca 0,5 ml) použijte v části B úlohy.

Centrifugační zkumavky je nutno přesně vyvážit! Vyvažování kyvet a spuštění centrifugy provádějte pouze pod dohledem personálu laboratoře.

PRAKTICKÁ ČÁST B. Identifikace DNA specifickou barevnou reakcí

Materiál a vybavení:

standardní roztok deoxyribosy (0,02 mg.ml⁻¹)
standardní roztok ribosy (0,02 mg. ml⁻¹)
standardní roztok DNA (1 mg. ml⁻¹ fyziologického roztoku)
standardní roztok RNA (1 mg. ml⁻¹ fyziologického roztoku)
roztok nukleové kyseliny (získaný v části A úlohy)
fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)
difenylaminové činidlo (roztok difenylaminu v kyselině octové a kyselině sírové)
zkumavky, pipety, dávkovače, odměrný váleček, Pasteurova pipeta, kahan a trojnožka nebo vaříč, hrnec, kruhový stojan na zkumavky

Postup:

Do zkumavek dávkujte podle rozpisu:

zkumavka č.	0,5 ml	zbarvení
1	fyziologický roztok	
2	deoxyribosa	
3	ribosa	
4	DNA	
5	RNA	
6	roztok nukleové kyseliny z části A *	

*cca 0,5 ml, rozpuštěný pelet získaný v části A úlohy

Ke vzorkům přidejte cca 1,5 ml difenylaminového činidla a zahřívejte je 10 minut na vroucí vodní lázni. Pozorujte zbarvení vzorků.

Difenylaminové činidlo nepipetujte – odměřujte válečkem nebo dávkujte pomocí Pasteurovy pipety!

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou v posledním sloupci.

Porovnejte zbarvení roztoku nukleoproteinu se zbarvením kontrolního vzorku (fyziologický roztok) a standardních roztoků ribosy, deoxyribosy, RNA a DNA. Uveďte, zda se zdařilo identifikovat přítomnost DNA v izolovaném produktu:

PRAKTICKÁ ČÁST C. Stanovení čistoty DNA spektrofotometrií v UV oblasti, denaturace DNA

Materiál a vybavení:

roztok nukleové kyseliny (získaný v části A úlohy – zředěný vzorek)
fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

zkumavky, pipety, fotometr, UV- propustné kyvety , kahan a trojnožka nebo vaříč, hrnec, kruhový stojan na zkumavky, ledová lázeň, filtrační papír, nálevka

Postup:

U zředěného roztoku peletu získaného v části A úlohy proměřte absorpční spektrum v oblasti vlnových délek 230 – 300 nm proti fyziologickému roztoku a srovnajte je se spektrem izolovaného nukleoproteinu uloženým v počítači. Měření provádějte v UV propustných plastových kyvetách. Jestliže dosahují absorbance vzorku v kterékoliv části spektra hodnot vyšších než cca 0,6, je nutno vzorek dále zředit fyziologickým roztokem (postačuje ředění odhadem). Ve spektru vzorku obsahujícího dostatečné množství DNA se objevuje absorpční maximum v okolí vlnové délky 260 nm; pokud je absorpční maximum v okolí vlnové délky 280 nm, obsahuje preparát převážně proteiny. Měření spektra provádějte pod dohledem vedoucího cvičení a **teprve po proměření spektra pokračujte další částí úlohy.**

Vzorek nevyhazujte, do dvou zkumavek pipetujte po 1 ml vzorku a zkumavku dobře uzavřete. Jednu zkumavku zahřívejte 15 minut na vroucí vodní lázni a poté její obsah rychle ochlaďte v ledové lázni.. Změřte absorbanci nativního (nezahřívaného) vzorku při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm. a absorbanci denaturovaného (zahřívaného a ochlazeného) vzorku při 260 nm. Měření provádějte v zúžených UV propustných plastových kyvetách a dbejte, aby paprsek fotometru procházel roztokem.

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou o zjištěné experimentální údaje (A_{230} , A_{260} , A_{280}), vypočtete poměry A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} a určete přibližné složení (obsah nukleových kyselin, obsah proteinů) v izolovaném preparátu. (Předpoklad: preparát neobsahuje další složky absorbující UV záření při vlnových délkách 260 a 280 nm.)

A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}

Popište čistotu získaného preparátu (obsah DNA, proteinů, nízkomolekulárních látek):

Uveďte absorbance při vlnové délce 260 nm:

A_{260} – nativní vzorek	A_{260} – denaturovaný vzorek

Získaný výsledek vysvětlete:

PRAKTICKÁ ČÁST D. Stanovení koncentrace DNA měřením absorbance v UV oblasti

Materiál a vybavení:

standardní roztok DNA (1 mg.ml⁻¹ fyziologického roztoku)

neznámý vzorek DNA pro kvantitativní analýzu

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

zkumavky, pipety, dávkovače, odměrná baňka 10 ml, vortex, fotometr, UV-propustné kyvety

Postup:

Standardní roztok DNA (1 mg.ml⁻¹) zředíte tak, že 0,25 ml standardního roztoku DNA doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promícháte. Stejným způsobem zředíte neznámý vzorek DNA. Podle tabulky připravte jednak sadu roztoků vzorků o šesti známých koncentracích DNA k sestrojení kalibrační závislosti (zkumavky 1-6) a dále 2 paralelní zkumavky s roztokem DNA o neznámé koncentraci (zkumavky 7-8). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok - nulová koncentrace DNA) použijete později jako slepý vzorek.

zkumavka č.	pipetovaný objem			c(DNA) [mg.ml ⁻¹]	A ₂₆₀
	zředěný standardní roztok DNA [ml]	zředěný neznámý vzorek DNA [ml]	fyziol. roztok [ml]		
1	0	0,0	2,5	0,000	0,000
2	0,5	0,0	2,0		
3	1,0	0,0	1,5		
4	1,5	0,0	1,0		
5	2,0	0,0	0,5		
6	2,5	0,0	0,0		
7	0,0	2,0	0,0	?	
8	0,0	2,0	0,0	?	

Změřte absorbanci vzorků při vlnové délce 260 nm proti slepému vzorku (zkumavka č.1). **Měření provádějte v UV plastových kyvetách.**

Prostudujte spektra nativní (dvouřetězové) a denaturované (jednořetězové) DNA uložená v počítači (zapište koncentraci vzorků a jejich absorbanci při vlnové délce 260 nm).

	koncentrace [mg.ml ⁻¹]	A ₂₆₀	ε (uved'te fyzikální rozměr!)
ds-DNA			
ss-DNA			

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace DNA ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky.

Vypočítejte průměr absorbancí ve zkumavkách č. 7-8 a doplňte do tabulky. Sestrojte kalibrační graf (závislost A_{260} na koncentraci DNA ve zkumavce). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte **koncentraci DNA ve zředěném neznámém vzorku** (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek. Ředění neznámého vzorku: _____ krát
Tímto faktorem vynásobte fotometricky zjištěnou koncentraci DNA a získáte koncentraci DNA v původním neznámého vzorku.

Výsledek:

koncentrace DNA v neznámém vzorku: $c =$ _____ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Ze směrnice přímky odečtěte miligramový absorpční koeficient DNA při vlnové délce 260 nm: ϵ_{260}
(doplňte fyzikální rozměr) : _____

Určete, zda standardní roztok DNA obsahoval nativní nebo denaturovanou DNA:

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)	

ÚLOHA 5C

A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀

A ₂₆₀ – nativní vzorek	A ₂₆₀ – denaturovaný vzorek

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 5D

zkumavka č.	A ₂₆₀
1	0,000
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

	koncentrace [mg.ml ⁻¹]	A ₂₆₀
ds-DNA		
ss-DNA		

Podpis vedoucího cvičení: