

**Masarykova univerzita  
Přírodovědecká fakulta**

**Ústav experimentální biologie**

**Bi4020c**

**Molekulární biologie - cvičení**

Metody stanovení koncentrace a čistoty DNA  
Restrikční endonukleázy a jejich využití  
Gelová elektroforéza  
Ultracentrifugace

Vyučující:

Mgr. Tibor Botka, Ph.D.  
tibor.botka@mail.muni.cz

# 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

**Hodnota absorbance neinformuje o velikosti izolované DNA**  
**=> gelová elektroforéza**

## Spektrofotometr NanoDrop 2000

Pro rutinní měření koncentrace a čistoty se využívá přístroj NanoDrop.

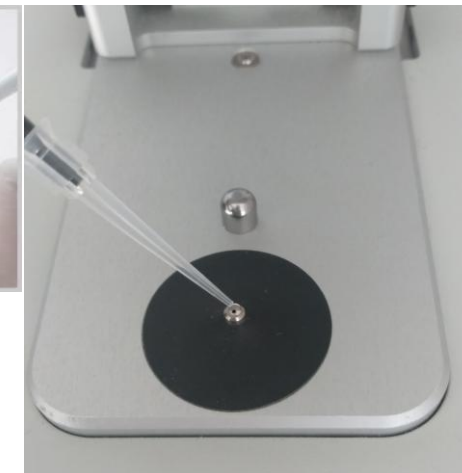
Výhody:

- objem měřeného vzorku je pouze 2 $\mu$ l
- šetří vzorek pro experimenty – výhoda oproti kyvetovým spektrofotometrům
- xenonová výbojka stačí pro cca 30 000 stanovení



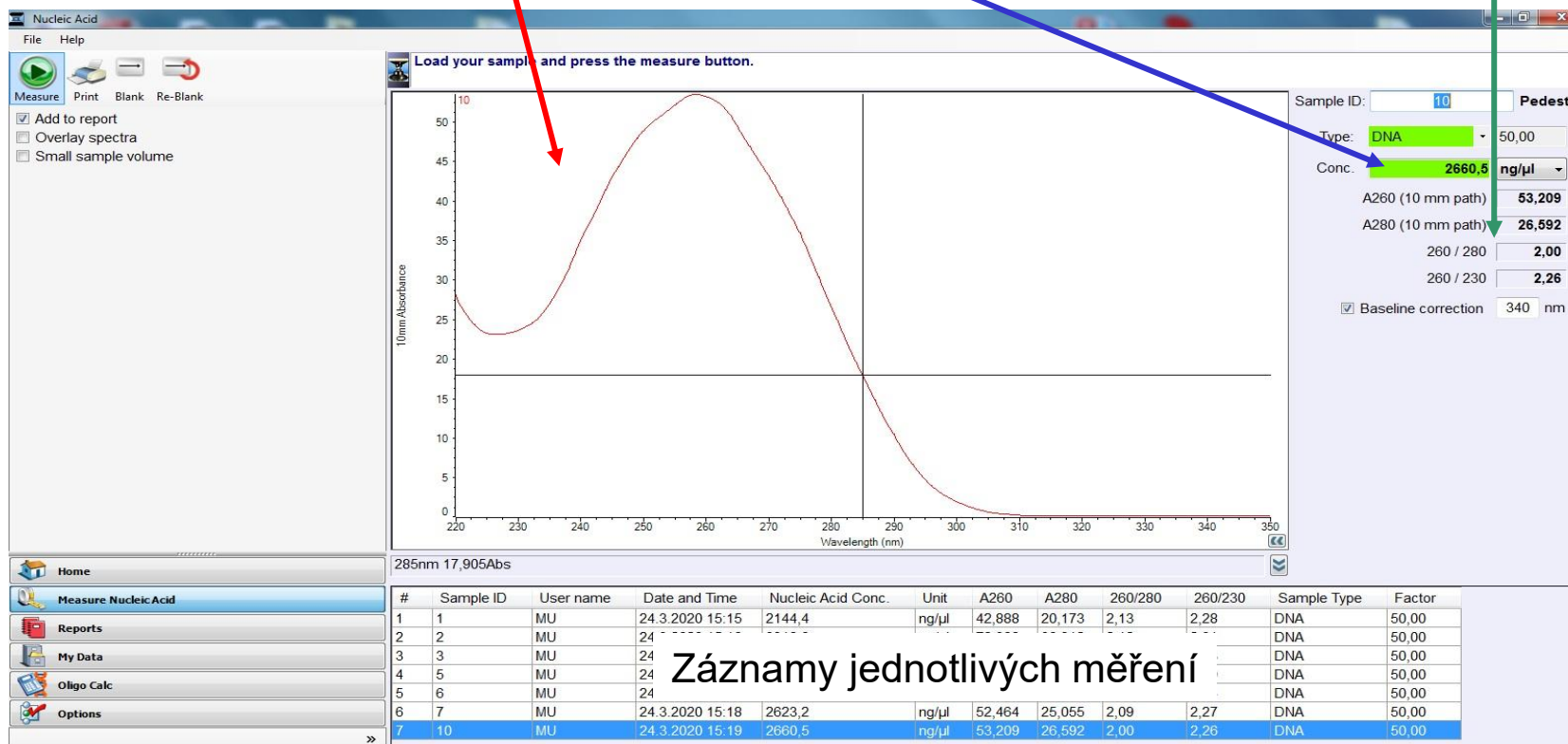
## Příprava vzorku DNA k měření:

- DNA se promíchá a **mžikově centrifuguje**
- Blank- měření absorbance rozpouštědla
- Měření vzorku



## Výstup měření:

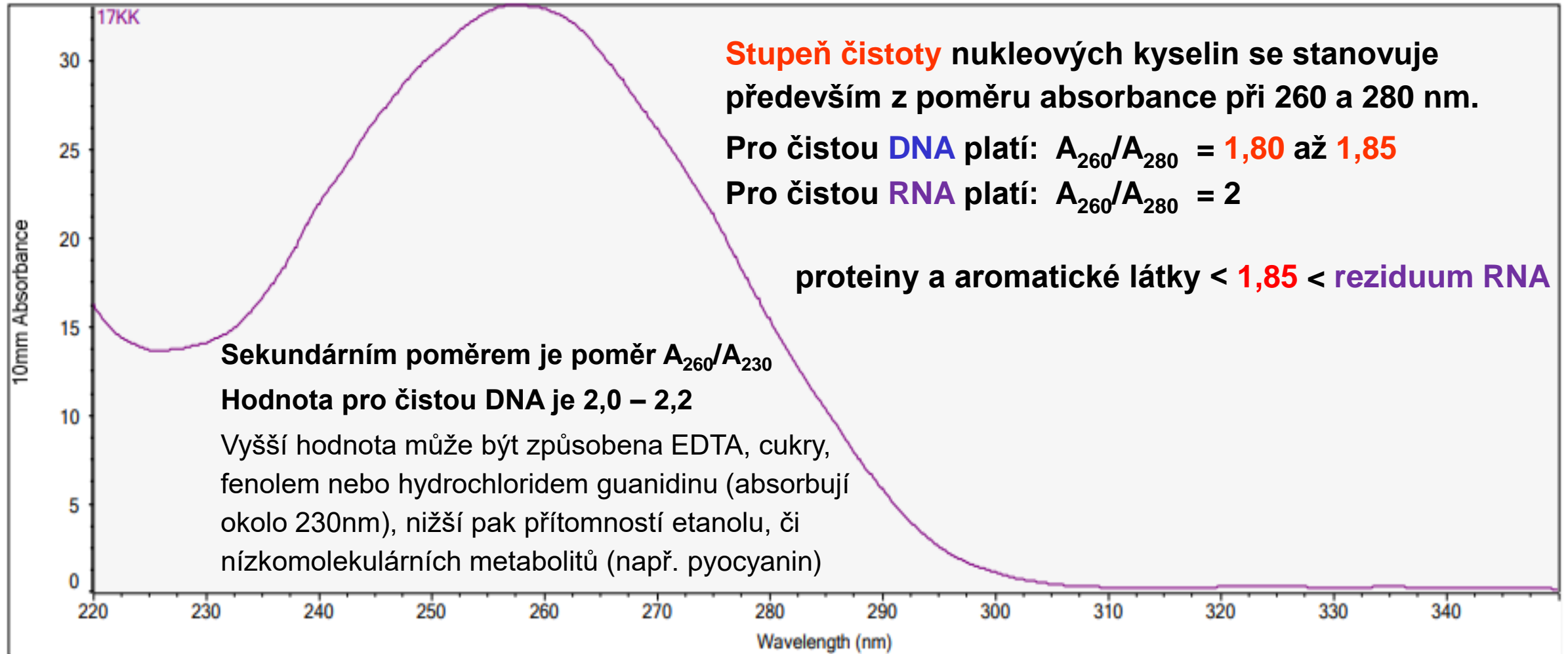
**č**řivka absorbance pro různé vlnové délky, **h**odnota koncentrace a **s**pecifické poměry absorbancí



mezi měřeními vždy  
očistit optické plochy!

# Vyhodnocení naměřených hodnot

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
13	17KK	LMDM	22. 3. 2018 13:47:55	1643,2	ng/μl	32,865	15,251	2,15	2,36	DNA	50,00



**Při reziduu RNA je naměřená koncentrace DNA nadhodnocená!**

# V případě potřeby je možné PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU

- **odstranění fenolu:**

extrakce chloroformem

- **odstranění proteinů:**

opakovaná deproteinace chloroformem, nebo enzymová degradace proteinů pomocí pronázy nebo proteinázy

- **odstranění RNA:**

enzymová degradace pomocí RNázy nebo specifické precipitační postupy

# Štěpení DNA restričními endonukleázami

**Restriční endonukleázy (restriktázy – zkr. RE)** = sekvenčně specifické endonukleázy, izolované z bakterií, štěpící fosfodiesterovou vazbu DNA v určité sekvenci nukleotidů.

**Přirozená funkce:** odbourávání cizorodé DNA (např. fágová DNA, plazmidy), ochrana vlastní DNA pomocí metylace (RM-systémy).

**Původ:** produkty bakterií

**Název:** rod/druh/kmen/serotyp

**EcoRI** (*Escherichia coli* kmen R, pořadové číslo 1)

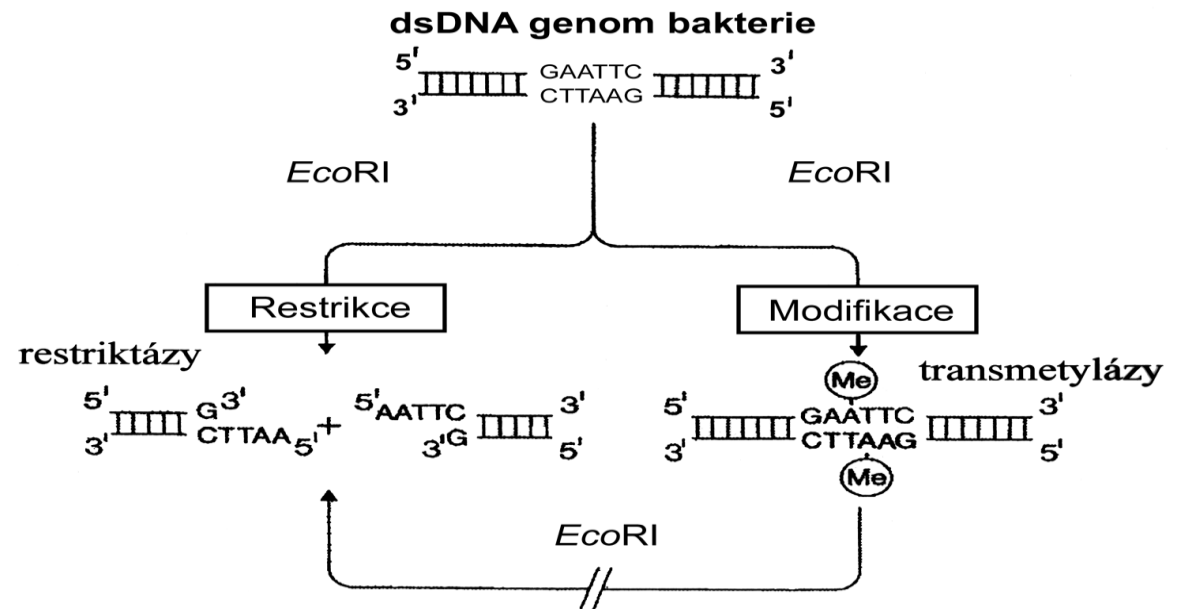
optimální teplota: 37° C

**BamHI** (*Bacillus amyloliquefaciens*) ... 37°C

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

**MaellI** (*Methanococcus aeolicus*)..... 55 °C

*EcoRI* restričně-modifikační (RM) systém



Gen kódující restriktázy *hsdR*

Gen kódující transmetylázu *hsdM*

Metylace adeninu a cytozinu

Donor CH<sub>3</sub> je S-adenozylmethionin



V bakteriích je RM systém tvořen několika součástmi (enzymatické podjednotky, nebo samostatné enzymy): typicky restriční, modifikační a specifickou. Ke štěpení DNA může docházet různými mechanismy v různé vzdálenosti od rozeznávané sekvence, a to v závislosti na typu **RM systému (I-IV)**. V **laboratorní praxi** se využívají především restriční enzymy (restriktázy), které štěpí DNA v místě rozeznávané sekvence - **RM typu II**. Mezi ně patří např. i ***EcoRI***. Výhodou je, že lze jednoznačně určit, kde ke štěpení dojde a využít to např. při klonování. Laboratorní restriktázy obvykle nemají modifikační funkci. Je známo více než 3000 REs rozpoznávajících cca 150 různých sekvencí.

**Typ I:** jeden proteinový komplex, štěpí náhodně ve velké vzdálenosti (>1kbp) od rozpoznávané nemetylované sekvence, využívá ATP,  $Mg^{2+}$  jako kofaktor, dochází k translokaci DNA.

**Typ II:** samostatné proteiny, štěpí úplně, v rozpoznávané palindromické nemetylované sekvenci o velikosti 4-8 bp, nevyužívá ATP, využívá  $Mg^{2+}$  jako kofaktor, nedochází k translokaci DNA.

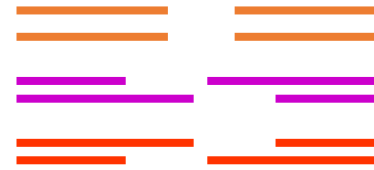
**Typ III:** jeden proteinový komplex, štěpí neúplně a náhodně v malé vzdálenosti (do 30 bp) od rozpoznávané nemetylované sekvence, využívá ATP,  $Mg^{2+}$  jako kofaktor, dochází k translokaci DNA.

**Typ IV:** jeden proteinový komplex, štěpí neúplně a náhodně v malé vzdálenosti (do 20 bp) od metylované rozpoznávané sekvence, nevyužívá ATP ale GTP, využívá  $Mg^{2+}$  jako kofaktor, dochází k translokaci DNA.

# RE-fragmenty dsDNA

## 3 typy RE-fragmentů:

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



```

>hsp60_SA_BamHI_F
GGATCCCTACGATCACCAAACCAGGTGCTTT
>hsp60_SA_EcoRI_R
GAATTCGAAATTGCTGGTGACGGTACGACAAC
    
```

**! POZOR!**

RE mohou mít relaxovanou specifitu (star activity), tzn. za neoptimálních podmínek mohou štěpit DNA v podobných sekvencích → riziko rozpadu plazmidového vektoru na několik fragmentů místo linearizace

```

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

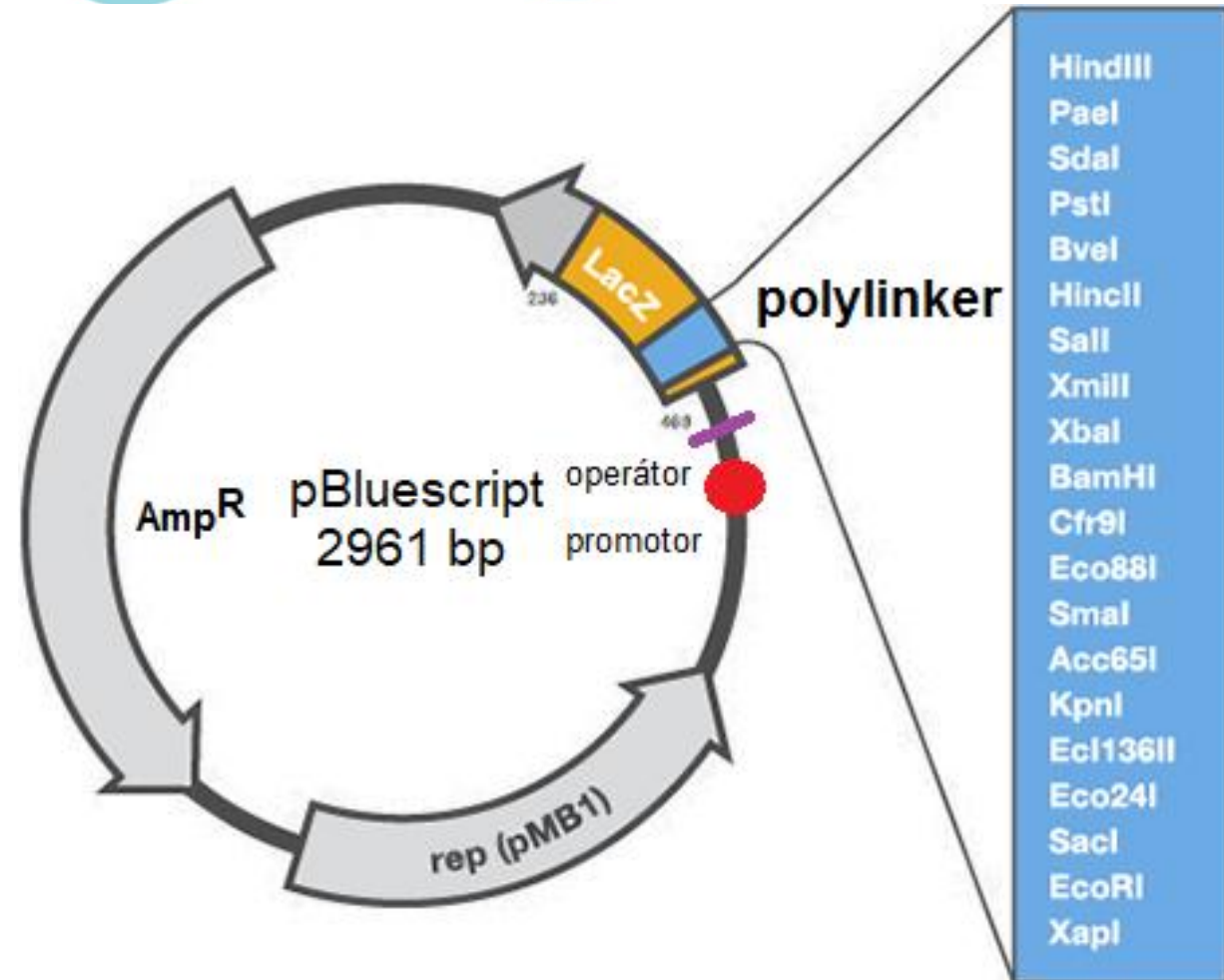
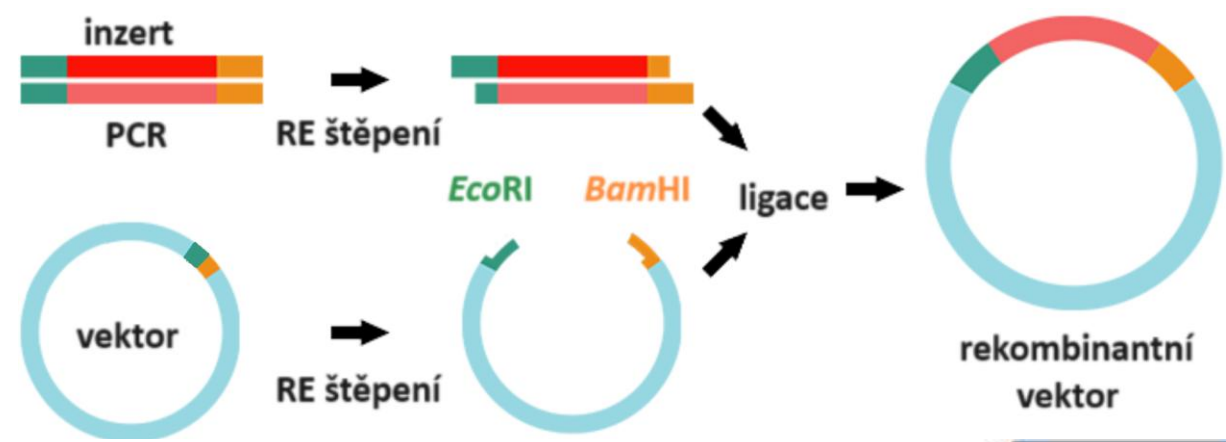
# Linearizace vektoru

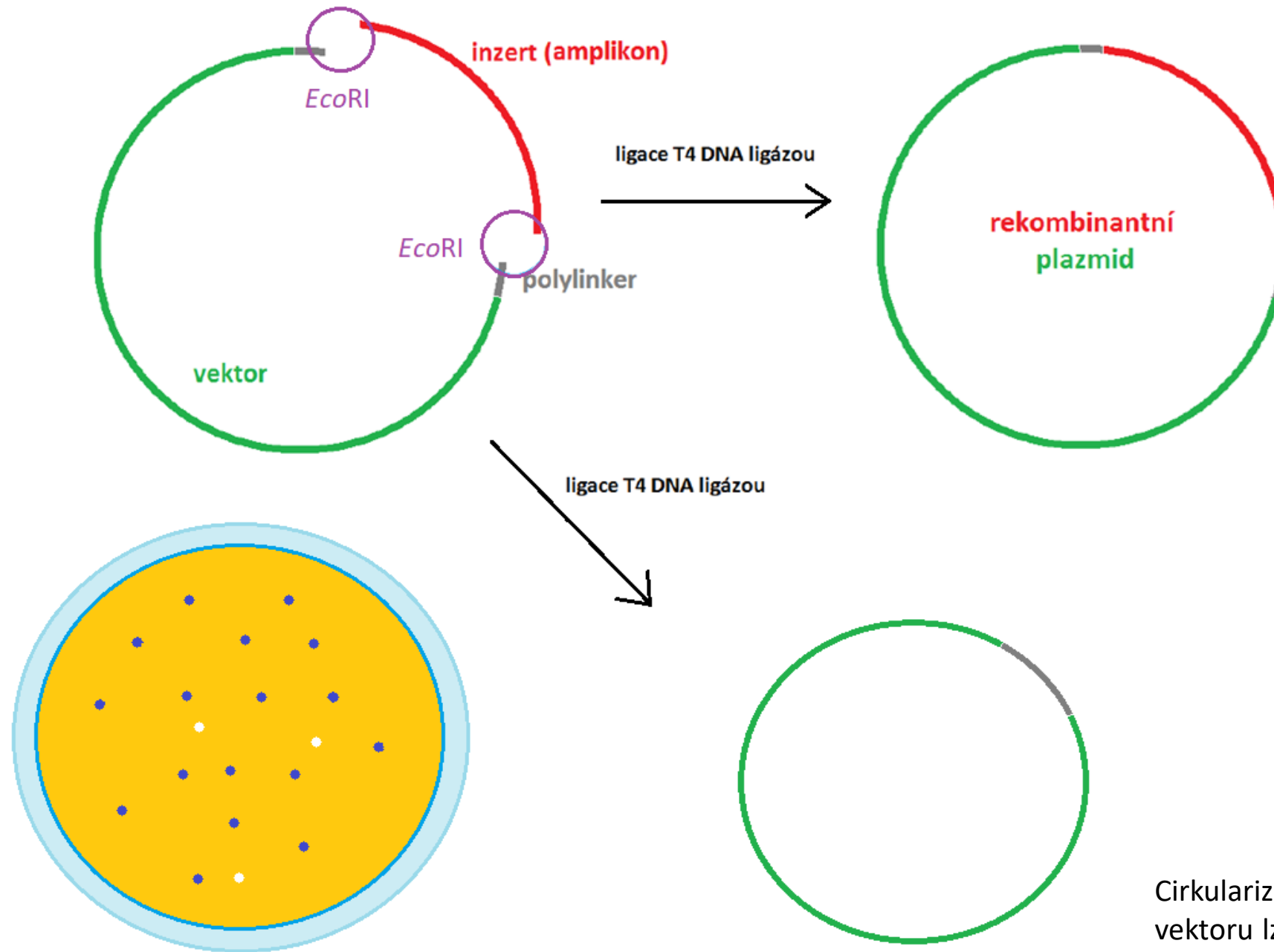
## Úprava vektoru a inzertu

**Gen pro rezistenci k ampicilinu** kóduje selekční marker, v prostředí s AMP přežívají jen buňky s vektorem.

**Gen pro beta-galaktosidázu** kóduje reportérový marker, při změně jeho funkce dojde ke změně barvy kolonie

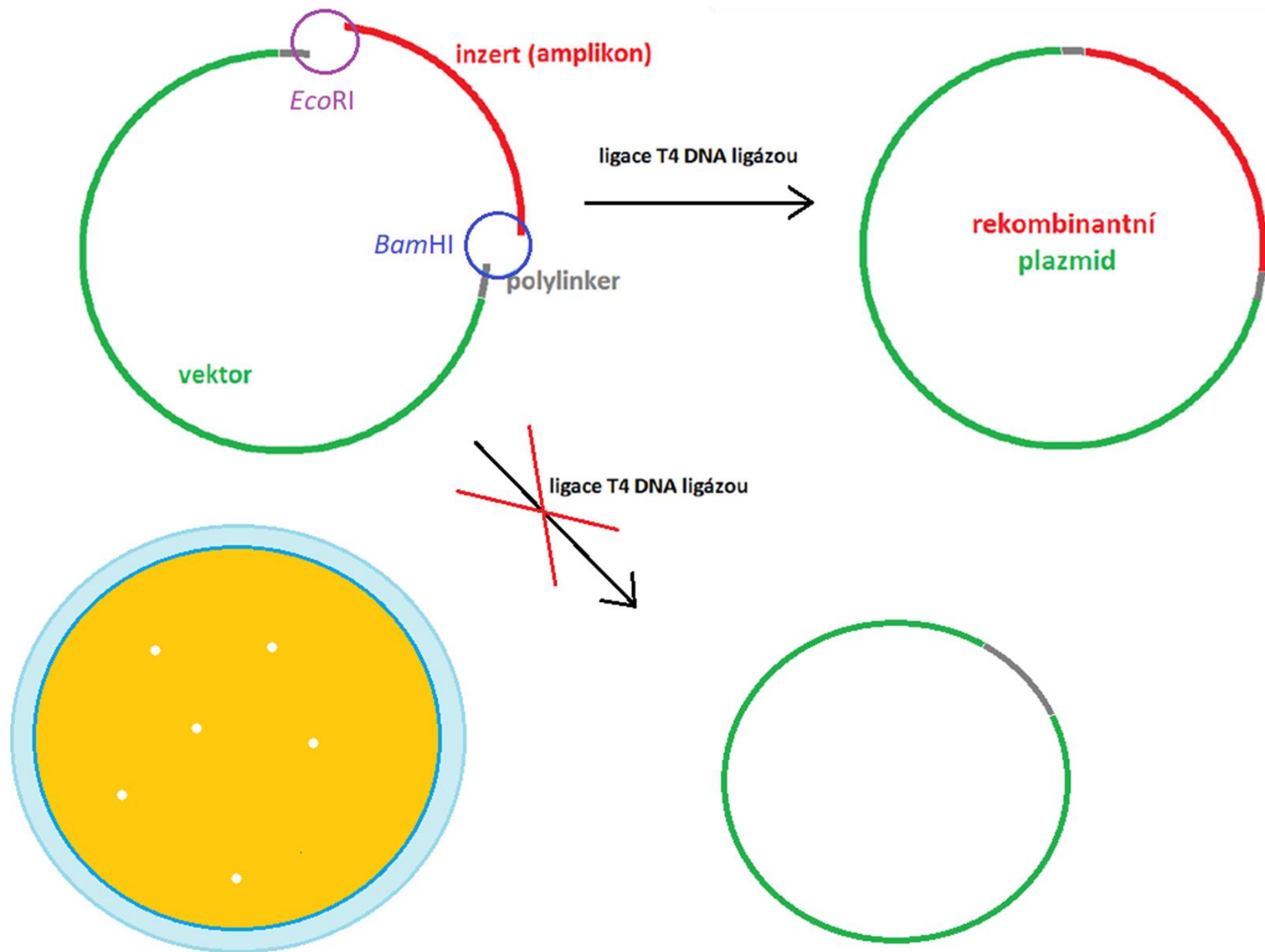
**Polylinker** (= MCS, mnohočetné klonovací místo) obsahuje několik restričních míst pro různé restriční endonukleázy. V tomto místě dochází k rozštěpení a následné ligaci s lineárním inzertem. Po ligaci se recirkularizuje rekombinantní vektor (= vektor+inzert).





modré kolonie obsahují vektor bez insertu  
bílé kolonie obsahují vektor s insertem  
buňky bez vektoru zahynou, tzn. netvoří kolonie

Cirkularizaci linearizovaného vektoru lze zabránit také jeho defosforylací pomocí alkalické fosfatázy.



# Příprava štěpící směsi

## Postup:

1. do sterilní Epp. zkumavky připravit **50  $\mu$ l** štěpící směsi, promíchat pipetováním, nevortexovat!
2. mžiková centrifugace
3. inkubace při **37 °C / >30 min.**
4. skladovat při +4°C

Jednotka enzymu = množství, které rozštěpí 1  $\mu$ g dsDNA fága  $\lambda$  za 1 hod. při optimální teplotě a podmínkách.

- A) Štěpící směs pro vektor (každý svůj vzorek):
- 43  $\mu$ l DNA (c = 100  $\mu$ g/ml)**
  - 5  $\mu$ l restričního pufru rCutSmart
  - 1  $\mu$ l *EcoRI*-HF a 1  $\mu$ l *BamHI*-HF (c = 20 U/ $\mu$ l)
- B) Štěpící směs pro inzert (1x na prac. sk.):
- 43  $\mu$ l DNA (c = 50  $\mu$ g/ml)**
  - 5  $\mu$ l restričního pufru rCutSmart
  - 1  $\mu$ l *EcoRI*-HF a 1  $\mu$ l *BamHI*-HF (c = 20 U/ $\mu$ l)



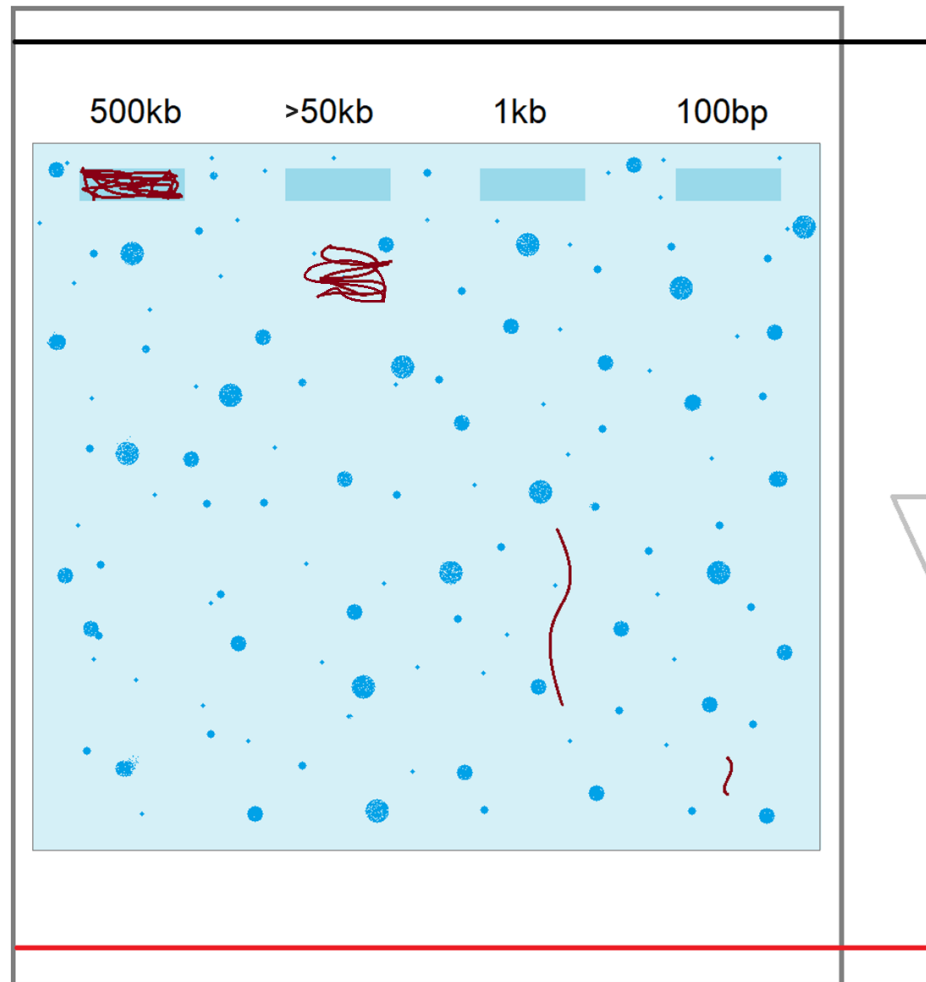
# Gelová elektroforéza

je jednou ze základních metod molekulární biologie



# Princip ELFO

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



-

Rychlost migrace DNA v gelu je ovlivněna molekulovou velikostí, napětím a směrem aplikovaného el. pole

- Rychlost pohybu lineární dsDNA je nepřímo úměrná logaritmu její velikosti.
- DNA se pohybuje ve spirále přímočaře a plynule od katody k anodě.
- Větší molekuly migrují pomaleji díky většímu tření (efekt molekulárního síta).
- Při nízkých hodnotách je rychlost migrace DNA proporcionální k napětí.
- Pro maximální rozlišení DNA > 2kb je horní hranice 5V/cm.
- DNA > 50 kb migrují v agarózovém gelu stejnou rychlostí a nelze je rozlišit.

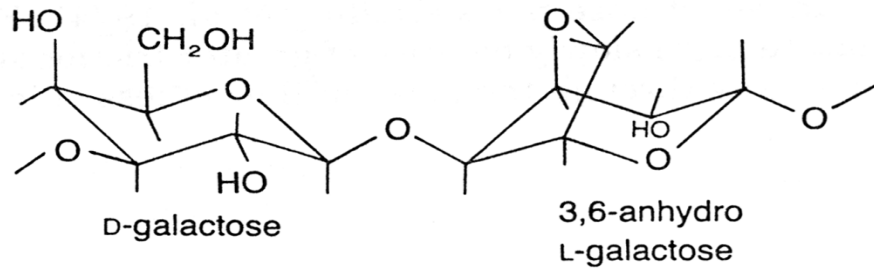
5V/cm

+



# GELY

- jsou tvořeny síťovitou strukturou polymerních molekul s póry
- jako nosič se používá **agaróza** (100 – 50 000 bp) nebo **polyakrylamid** (10 – 1 000 bp)

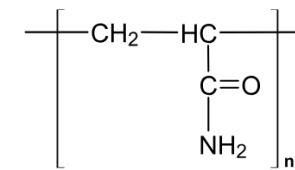
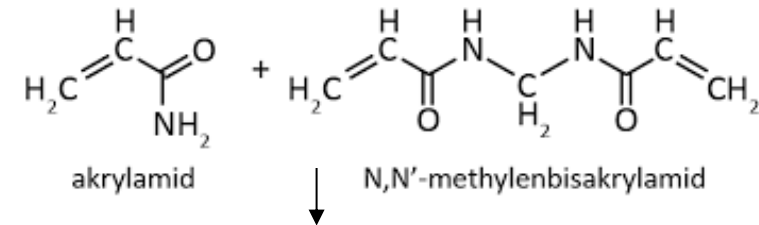


**Agaróza** je lineární polymer, původ z mořské řasy, různá úroveň purifikace (nesmí obsahovat endonukleázy), různé parametry (low melting, EEO,...)

**Nízkotající agaróza (low-melting):** teplota tání a tuhnutí (24-30°C) je nižší než u standardní agarózy. Preparativní gely, příprava vzorku při PFGE.

**EEO (elektroendoosmóza):** Agarová vlákna obsahují disociovatelné skupiny, které za alkalického pH nesou negativní náboj. To se projevuje elektroendoosmózou, tj. tokem pufru směrem ke katodě, tj. proti směru dělení DNA molekul. Výsledkem jsou neostré proužky.

-> Využití agaróz s co nejnižší EEO.



*Monomer je toxický (neurotoxin)!*

*Polymer (poly(2-propenamid)) je zesíťován N,N'-methylenbisakrylamidem*

**PAGE** metoda pro separaci bílkovin a malých NK, rychlost migrace je závislá na hmotnosti i struktuře (funkce proteinu je zachována). **SDS-PAGE** využívá denaturace proteinů v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který uděluje proteinu záporný náboj přímo úměrný jeho molekulové hmotnosti.

Bez přítomnosti iontů je rychlost migrace DNA v gelu nízká nebo žádná. Mobilita DNA je ovlivněna iontovou silou a složením **elektroforetického pufru**:

**TRIS-acetátový (TAE): 0,04M Tris-acetát, 0,002M EDTA, pH 8,2**

- *separace lineárních molekul DNA*



Možné riziko pro respirační trakt při dlouhodobé expozici, kat. 2

**TRIS-borátový (TBE): 0,089M Tris-borát, 0,089M kyselina boritá, 0,002M EDTA; pH 8,5**

- *separace molekul menších než 1 kb, déletrvající ELFO, vysoké napětí*



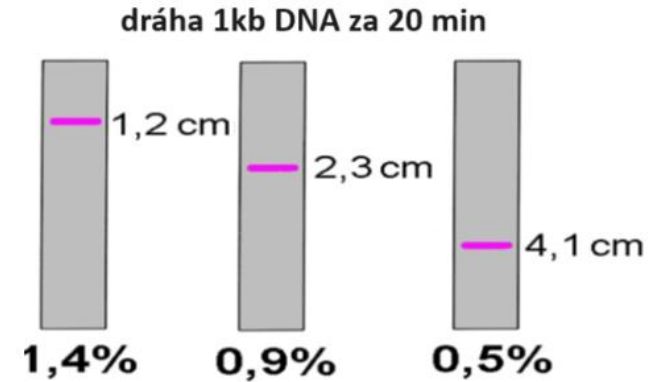
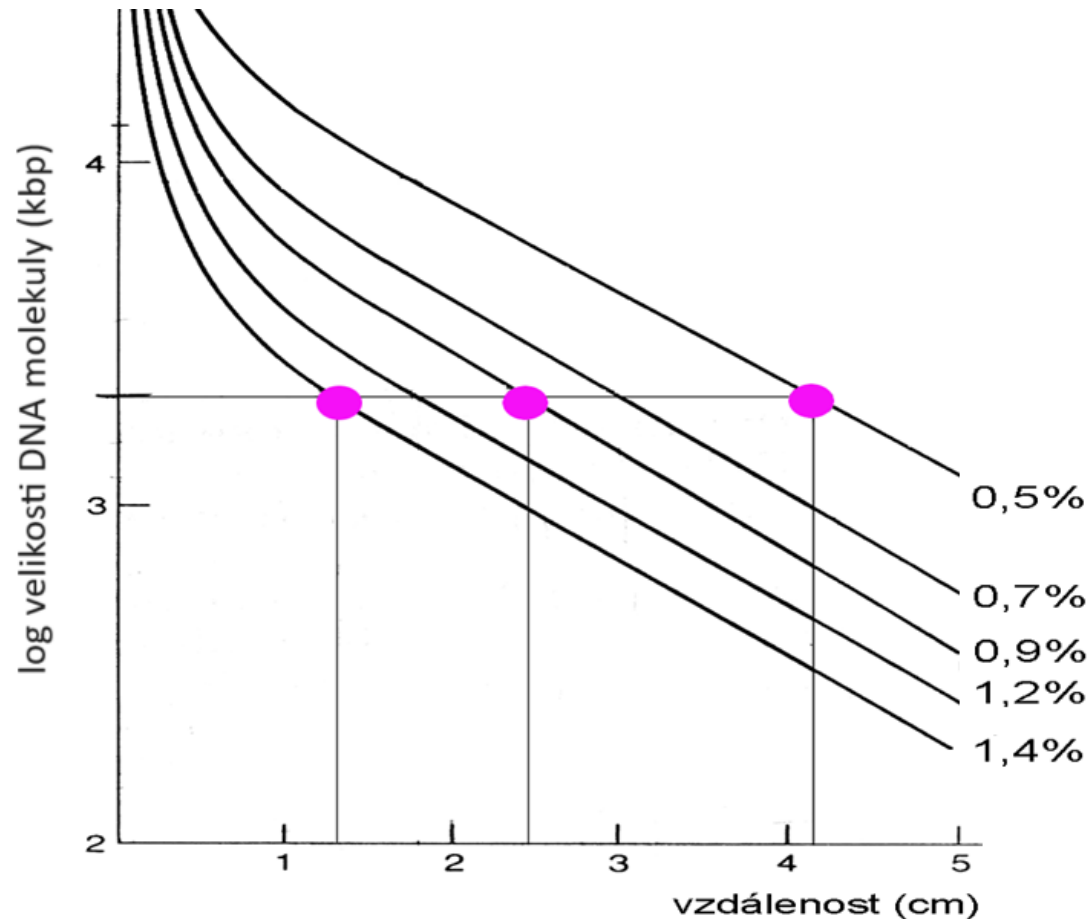
Nebezpečný pro reprodukci a plod, kat. 1 !!!

**TRIS-fosfátový (TPE): 0,08M Tris-fosfát, 0,008M EDTA, pH 7,5**

- *separace ssDNA*

*Obvykle se připravuje 10-50× koncentrovaný zásobní roztok, který se ředí na pracovní koncentraci. Stejný pufr se využívá i pro přípravu gelu!*

# Pohyb fragmentů DNA v gelu v závislosti na jeho koncentraci

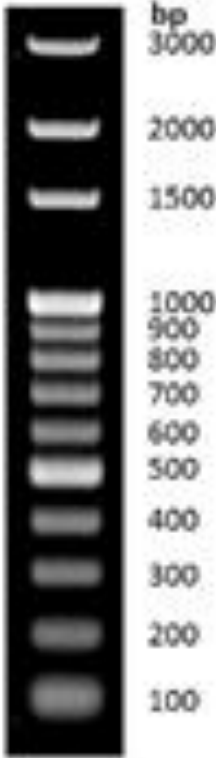


Separace DNA fragmentů v gelu  
v závislosti na koncentraci agarózy

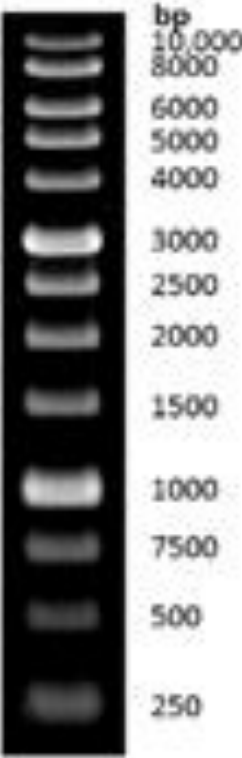
koncentrace agarózy (%)	rozsah dělení dsDNA (kb)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 4
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Elektroforetická pohyblivost DNA je nepřímo úměrná logaritmu její velikosti. Mobilita DNA vzrůstá s klesající koncentrací gelu.

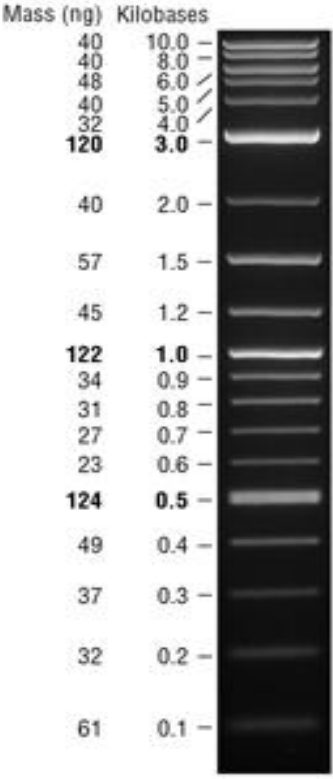
**Marker** = směs obvykle lineárních fragmentů DNA s definovanou délkou, umožňuje určit velikost molekul DNA (amplikony, fragmenty DNA) po proběhnutí elektroforézy porovnáním. Je třeba použít marker s odpovídající topologií, aby byla mobilita vzorku a markeru porovnatelná.



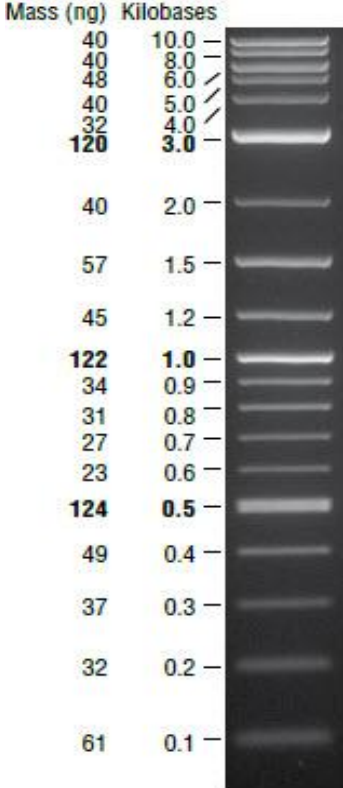
100bp



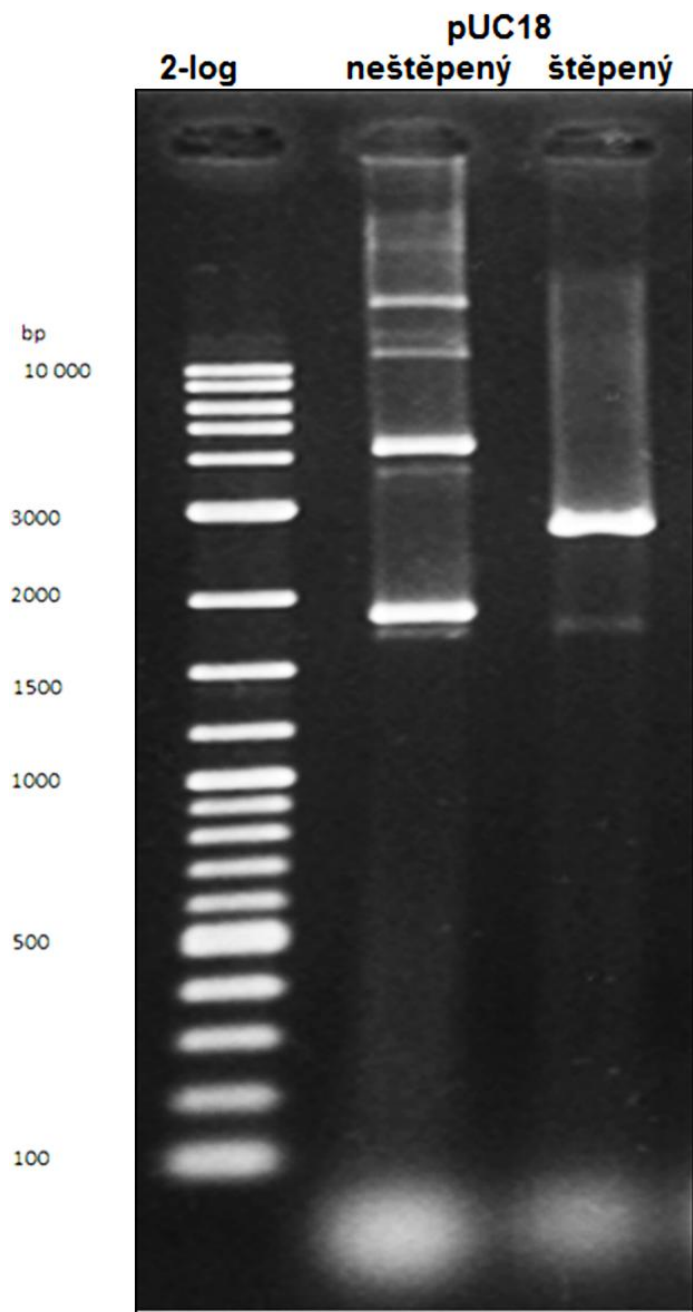
1kb



1kb Plus



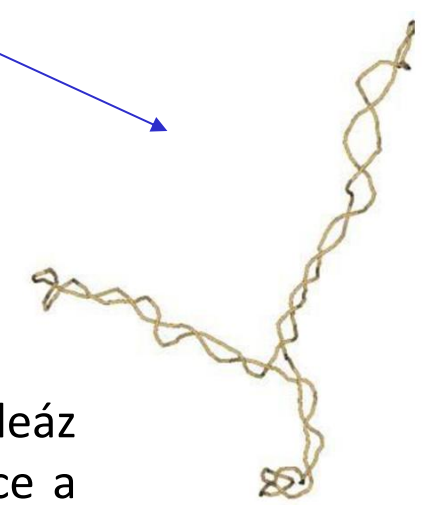
2-log



dimery	kovalentně uzavřená	otevřená kružnicová	lineární
OC pDNA	CCC dsDNA	OC dsDNA	L dsDNA
Lds pDNA			
CCC pDNA			

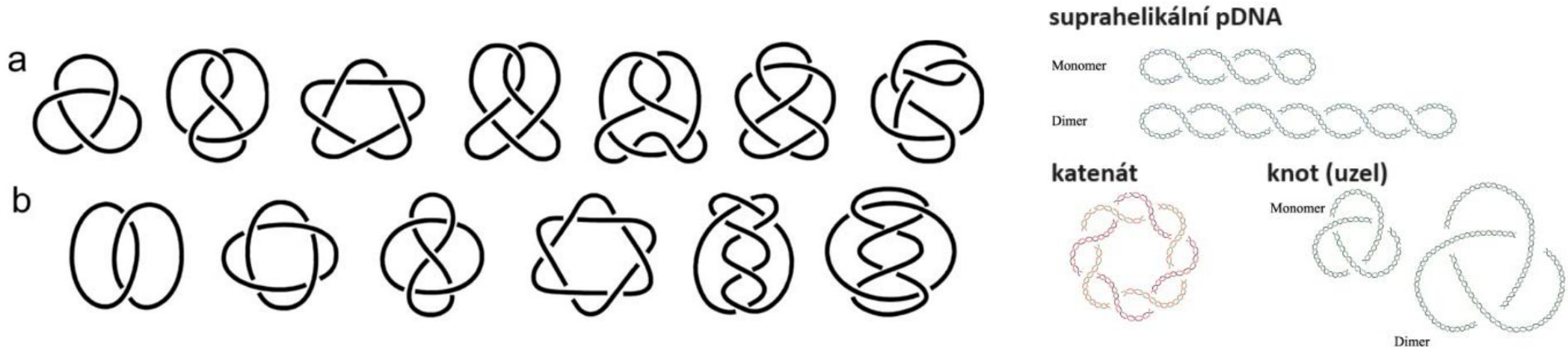
Kovalentně uzavřená cirkulární DNA (ccc dsDNA) izolovaná z buněk je prakticky vždy suprahelikální (supercoiled, forma I)

Zavedením jednořetězcového zlomu dochází k relaxaci plazmidu a vzniku otevřené kružnicové formy (oc dsDNA, forma II)



Působením restričních endonukleáz dochází k přerušení dvoušroubovice a linearizaci plazmidu.

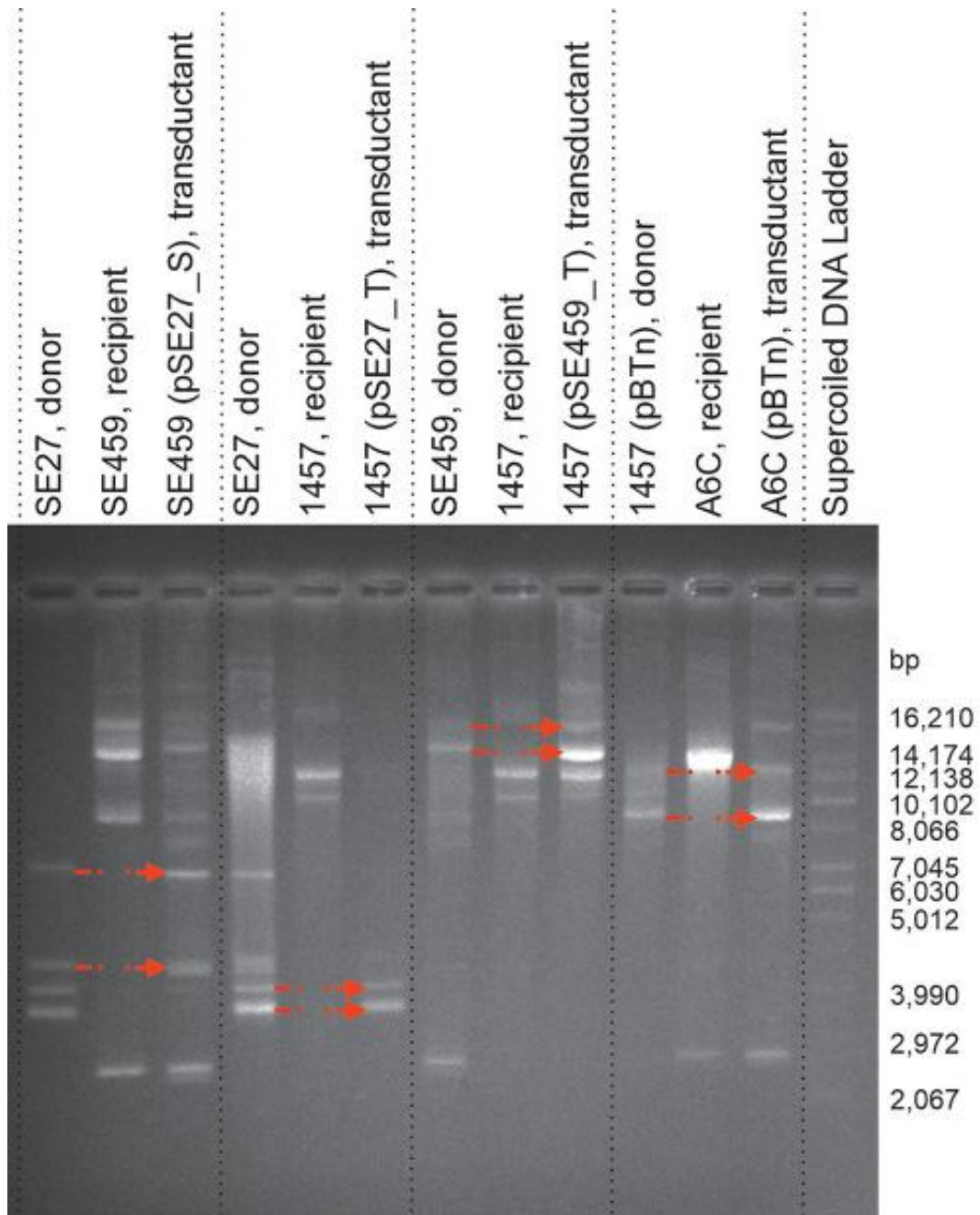
Vlivem působení topoizomeráz, rekombináz a reparativních enzymů vznikají struktury typu knot (propletení v rámci jedné cirkulární DNA) a katenát (dvě propletené cirkulární DNA), které mají nekonečně mnoho forem. Nejjednodušší jsou uvedeny níže (A knoty, B katenáty)



[10.1128/microbiolspec.PLAS-0036-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0036-2014)

Mobilita těchto minoritních forem je velice variabilní a je významně ovlivněna hustotou gelu (vyšší hustota může vést k „zaseknutí molekuly“ v gelu) a použitým napětím. Pro jejich separaci se používá nízkých koncentrací (cca 0,4-0,6% gel) a nízkého napětí (cca 1V/cm). Míra výskytu těchto forem je závislá i na kmeni, ve kterém dochází k replikaci plazmidu.





Příklad rozdílné mobility plazmidových forem v závislosti na kmeni. Elektroforetogram ukazuje distribuci plazmidové DNA v kmenech po přenosu plazmidů pomocí transdukce z donorů do recipientů. Přenesené plazmidy jsou označeny červenou šipkou. Lze pozorovat odlišnou distribuci proužků především u recipientů a transduktantů.

# PFGE

## Pulzní gelová elektroforéza / gelová elektroforéza v pulzním poli

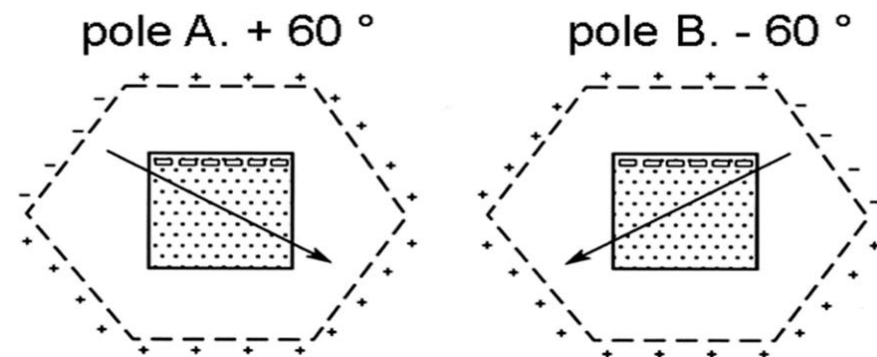
Gelová elektroforéza v **pulzním poli** používá více než jedno elektrické pole, ta se aktivují střídavě po dobu tzv. **pulzního intervalu**.

Jednotlivá pole se liší svým **směrem**. Úhel mezi dvěma střídajícími se elektrickými poli se nazývá **reorientační úhel**.

Aby se molekuly DNA mohly pohybovat ve směru změněného elektrického pole, musí se nejprve **reorientovat**. Větší molekuly DNA spotřebují na svou reorientaci více času než molekuly menší, proto je jejich pohyb gelem pomalejší.

Pokud mají jednotlivá pole stejné napětí a pulzní časy, je výsledná dráha pohybu přímá.

PFGE dokáže od sebe rozlišit molekuly DNA o velikosti 6 kbp – 10 Mbp (konvenční ELFO max. 50 kbp).



**FIGE** (Field Inversion Gel Electrophoresis) – aplikace přímého ( $180^\circ$ ) dopředného a reverzního pole, kdy pulzní čas dopředného pole je delší než u reverzního.

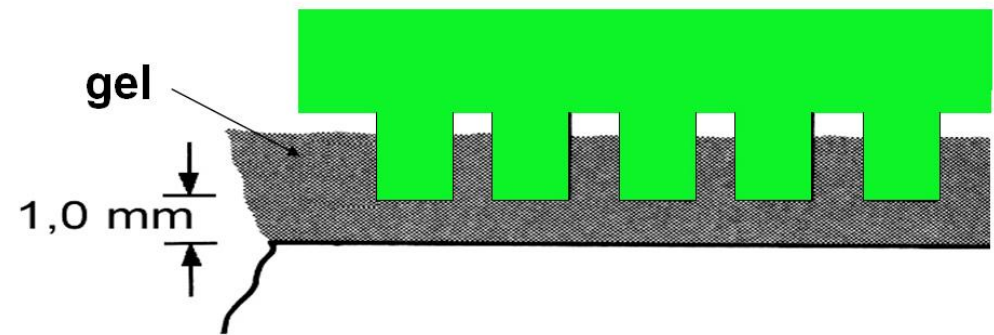
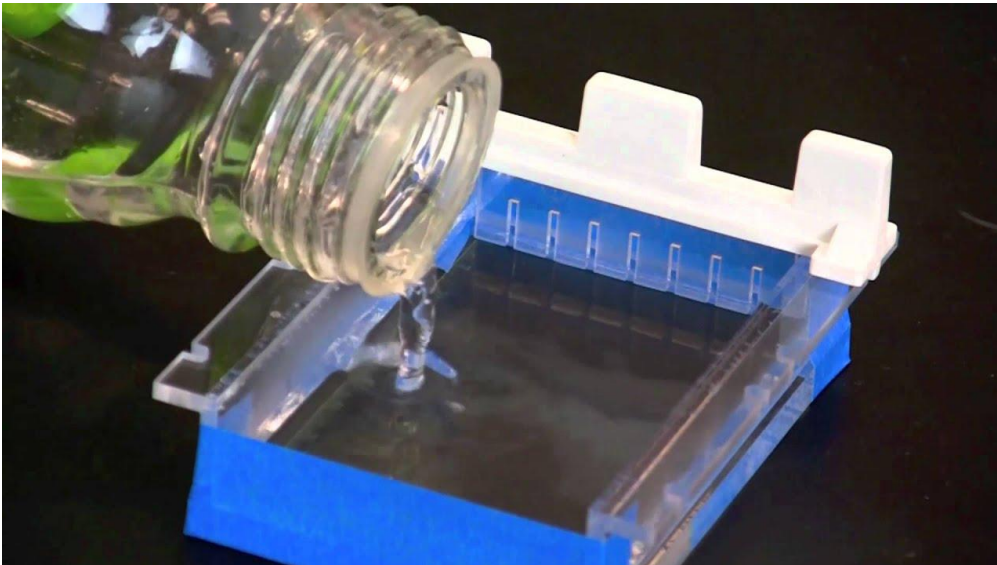




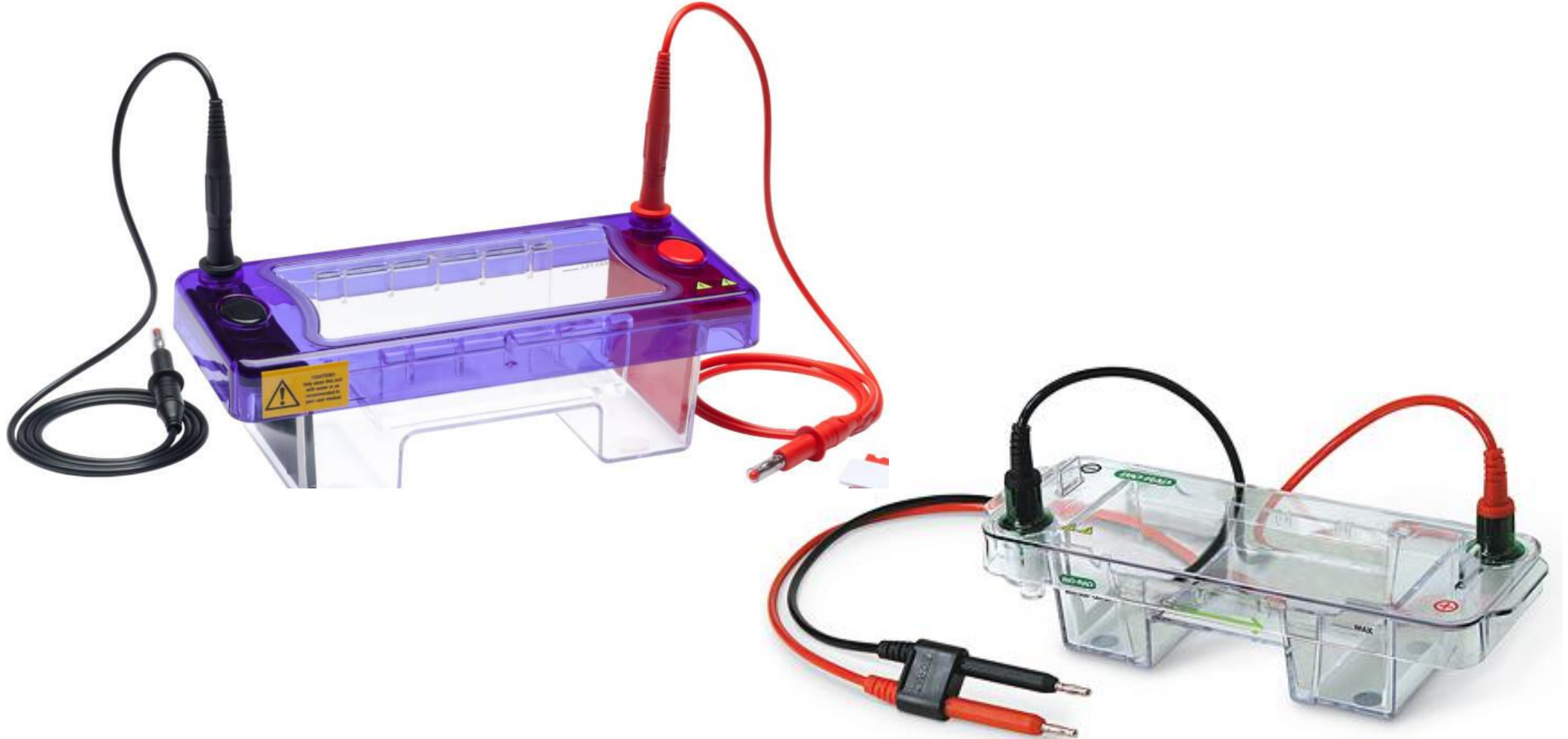
ELFO - postup

# Příprava gelu pro ELFO

1. **Vypočítat objem gelu (výška gelu  $\geq 5$  mm)**
2. **Připravit 500 ml 1×TAE pufr ze zásob. roztoku konc. 50×**
3. Navážit agarózu a smíchat s 1×TAE pufrém tak aby vznikl 1,5% gel
4. Rozvařit agarózu 10 min/100°C
5. Opatrně promíchat, vytemperovat na 50 °C
6. **Nalít do vyrovnaného tvořítka tak, aby nevznikly bubliny**
7. **Nechat gel ztuhnout (20 min)**



- > přenést gel i s formou do ELFO vany, hřebínek u katody (-)
- > přelit 1x TAE pufrem, hladina cca 3 - 5 mm nad gelem
- > po přelití pufrem vytáhnout hřebínek kolmo nahoru



Aby vzorek při nanášení do jamky klesal k jejímu dnu, míchá se s nanášecím pufrem. Tento pufř vzorek zároveň obarví a v průběhu ELFO nám putující barvička dává ilustrativní přehled o vzdálenosti, kterou vzorek o odpovídající velikosti urazil.

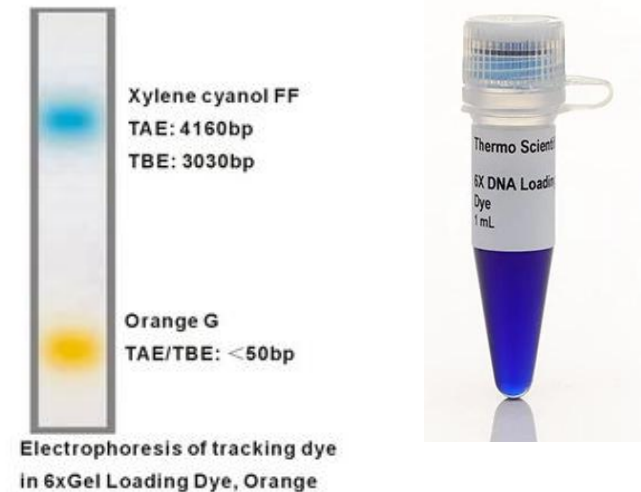
Obvykle bývá 4 – 6 krát koncentrovaný.

Může se použít např.

0,25% bromfenolová modř (obarví)

40% (w/v) sacharóza ve vodě (zvýší hustotu)

Existuje několik typů nanášecích pufřů, které mohou obsahovat místo sacharózy glycerol nebo Ficol 400.



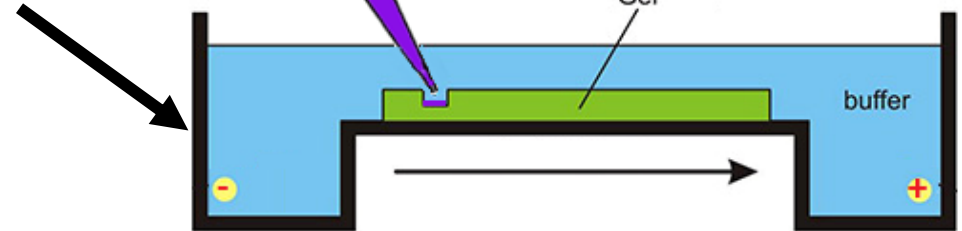
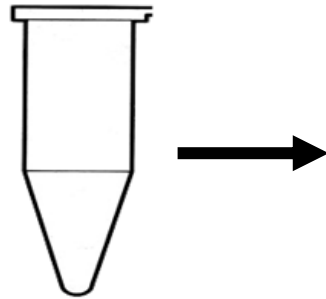
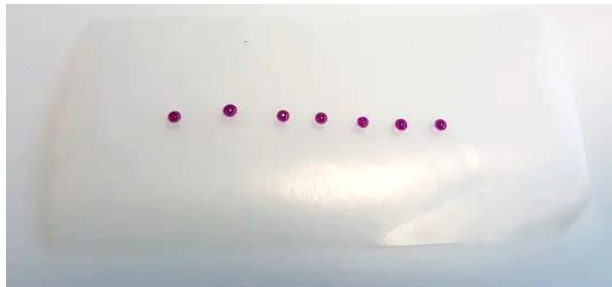
# Příprava vzorku DNA pro nanášení do gelu

nanášecí pufr je 6× koncentrovaný

Správně zapojit!  
nastavit napětí 5 V/cm



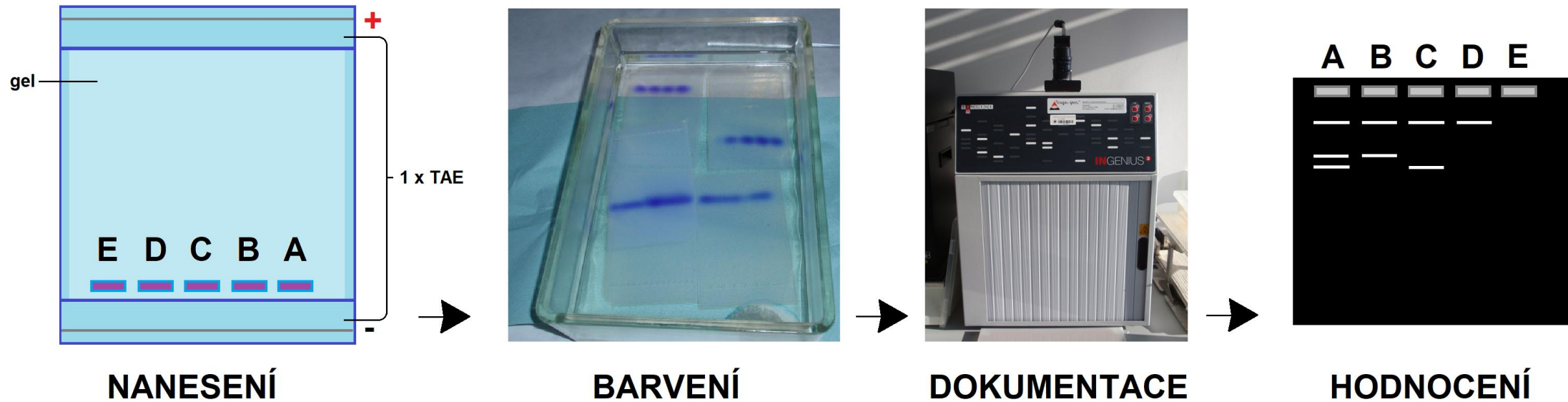
roztok DNA



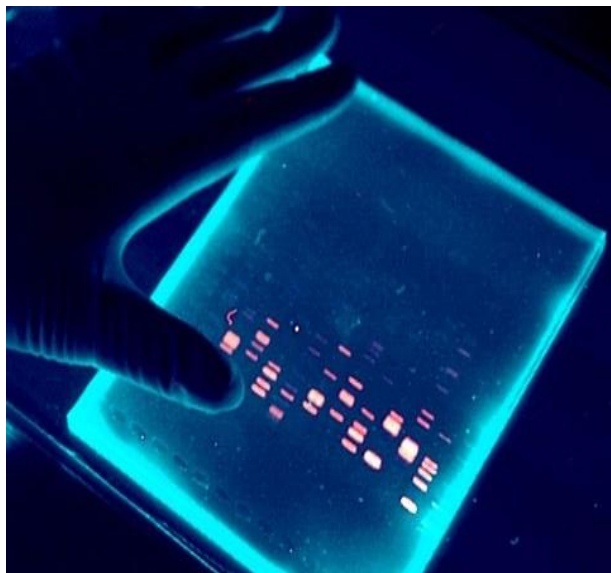
- 1) neštěpená pDNA: 8  $\mu$ l + kapka NP
- 2) štěpená pDNA: 10  $\mu$ l + kapka NP

- nanášet vzorky s nanášecím pufr
  - špička pod hladinou 1× TAE pufru
  - vhodný marker (4  $\mu$ l)
- ZAPSAT SI POŘADÍ!**





Barvení DNA v gelu: chemikálie využívané pro barvení jsou díky vazbě na DNA potenciálními **mutageny!**



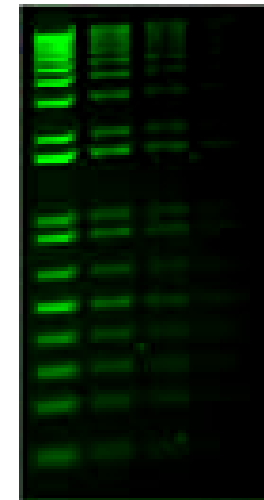
DNA v UV světle 302 nm

Přidávat EtBr přímo do gelu?

EtBr snižuje elektroforetickou mobilitu lineárních molekul asi o 15% a odstraňuje suprahelikální otočky.

Interkalací EtBr se prodlužuje fyzická délka molekul DNA (lineárních a OC).

RedGel = dvě etidiové podjednotky spojené spacerem -> stejné spektrum, bezpečnější (neprochází přes buněčnou membránu)



cyaninová barviva (SYBR): až 100 × citlivější než EtBr, bezpečnější.

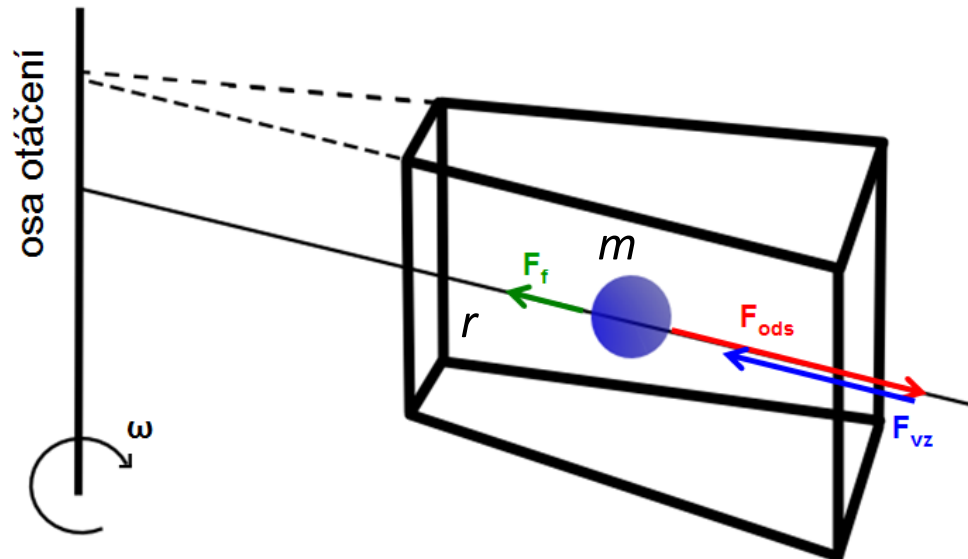
# Centrifugace

- je separační metoda založená na pohybu částic v tekutém mediu vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy.
- během centrifugace působí na částici odstředivá síla

$$F_{ods} = m \omega^2 r$$

$$\omega = 2\pi f$$

$$f/60 = \text{rpm}$$



$F_f$  = frikční (třecí) síla

$F_{ods}$  = odstředivá síla

$F_{vz}$  = vztlaková síla

$\omega$  = úhlová rychlost

$r$  = vzdálenost částice od osy otáčení

$m$  = hmotnost částice

$\omega^2 r = a$  (zrychlení)

$F_{ods} = ma$



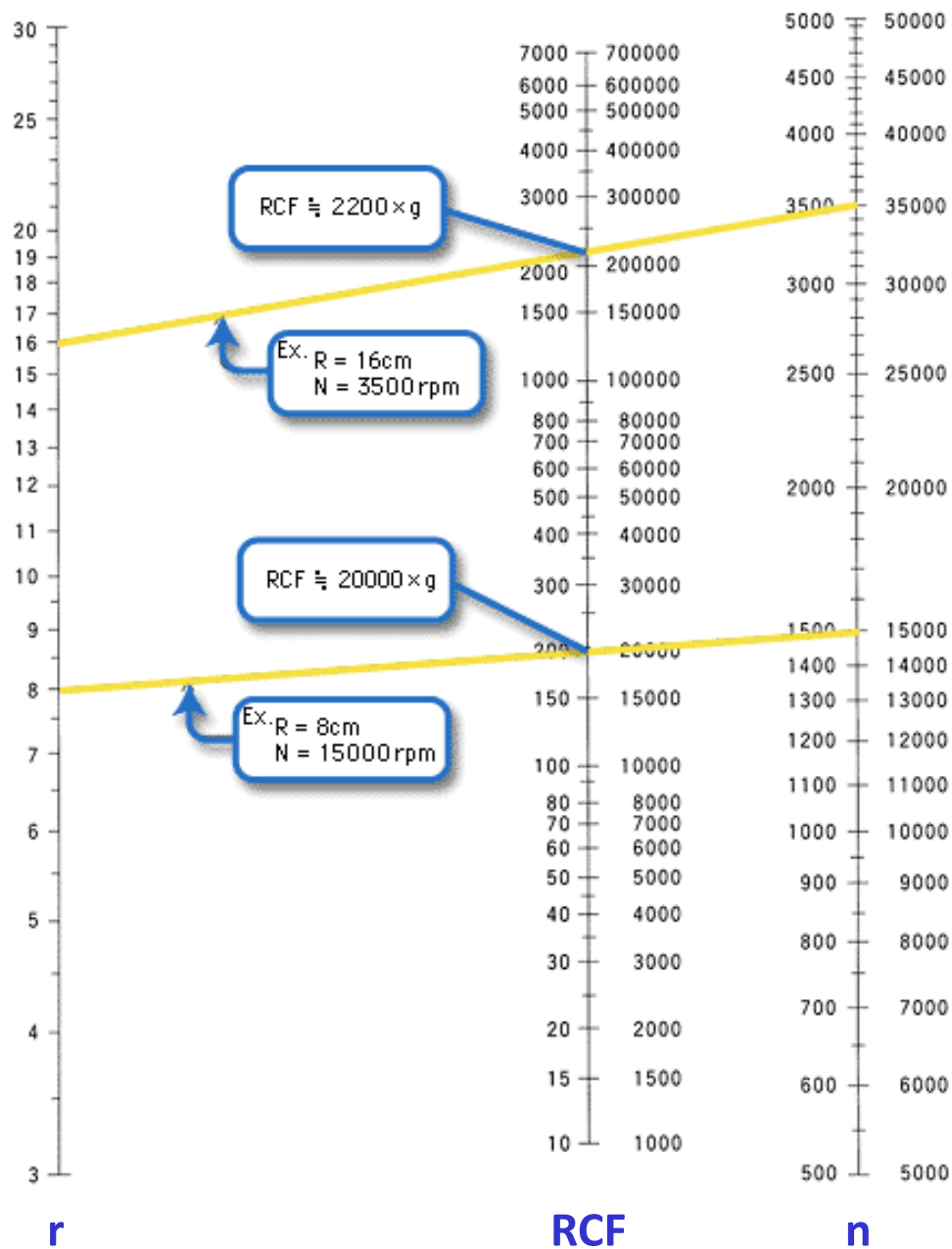
# Relativní odstředivá síla

Parametry centrifugace se nejčastěji vyjadřují relativní odstředivou silou RCF.

$$\text{RCF} = \frac{m \omega^2 r}{m \cdot g} = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (\text{jednotka} = g)$$

RCF se uvádí v násobcích gravitačního zrychlení  $g$  ( $g = 980 \text{ cm/s}^2$ )

# Nomogram pro přepočet RCF a rpm



$$RCF = 1,119 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

RCF – relativní odstředivá síla

n – počet otáček za minutu

r – poloměr otáčení od osy rotoru

- **první ultracentrifuga byla vyvinuta švédským biochemikem Svedbergem (1926 - Nobelova cena)**
  - max. 80000 otáček za minutu
  - odhalil charakter proteinů – kompaktní částice s definovanou hmotností

## **DNES:**

### **1) preparativní ultracentrifugace**

- nezbytná součást izolace proteinů, nukleových kyselin, buněčných organel a virů

### **2) analytická ultracentrifugace**

- stanovení molekulových hmotností z rychlostí jejich sedimentace v roztoku
- využívá se hustotní gradient inertní látky s malou molekulovou hmotností (např. sacharóza) nebo gradient vytvořený rychle difundující látkou (např. CsCl)
- optický systém pro sledování průběhu
- rychlost sedimentace částice závisí na její hmotnosti - vlivem gravitačního (centrifugačního) pole se rychlost pohybu částic zvyšuje, dokud nejsou na ně působící síly v rovnováze
- využito např. pro charakterizaci ribozomů

Nízkootáčková centrifugace do 20tis.  $\times$  g

Vysokootáčková centrifugace 20tis. – 100tis.  $\times$  g

Ultracentrifugace 100tis. – 1mil.  $\times$  g

### **Preparativní**

izolace nebo purifikace biomakromolekul

### **Analytická**

identifikace / charakterizace částice

(např. stanovení její velikosti (mol. hmotnosti), sedimentačního koeficientu, vznášivé hustoty apod.).

# Základní centrifugační metody

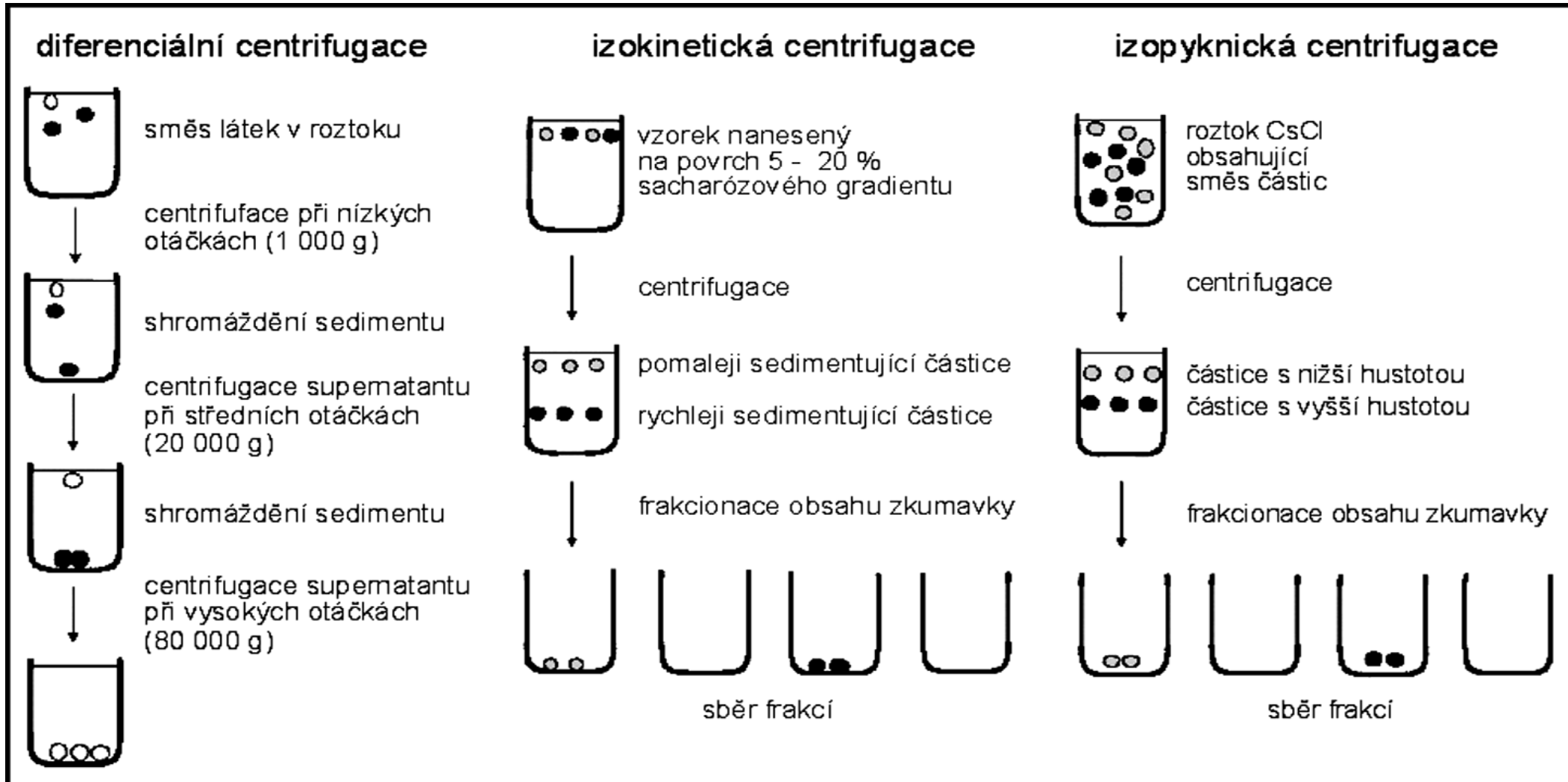
## zonální centrifugace v hustotním gradientu

podle rychlosti sedimentace

- gradient se tvoří nanášením vrstev
- sedimentační koeficient (S)

podle hustoty částic

- gradient vzniká při centrifugaci
- vznášivá hustota ( $\rho$ )



# Sedimentační koeficient

=  $dr/dt$ , tj. charakterizuje rychlost pohybu částice při izokinetické centrifugaci (přepočítává se na standardní sedimentační koeficient)

## Využití:

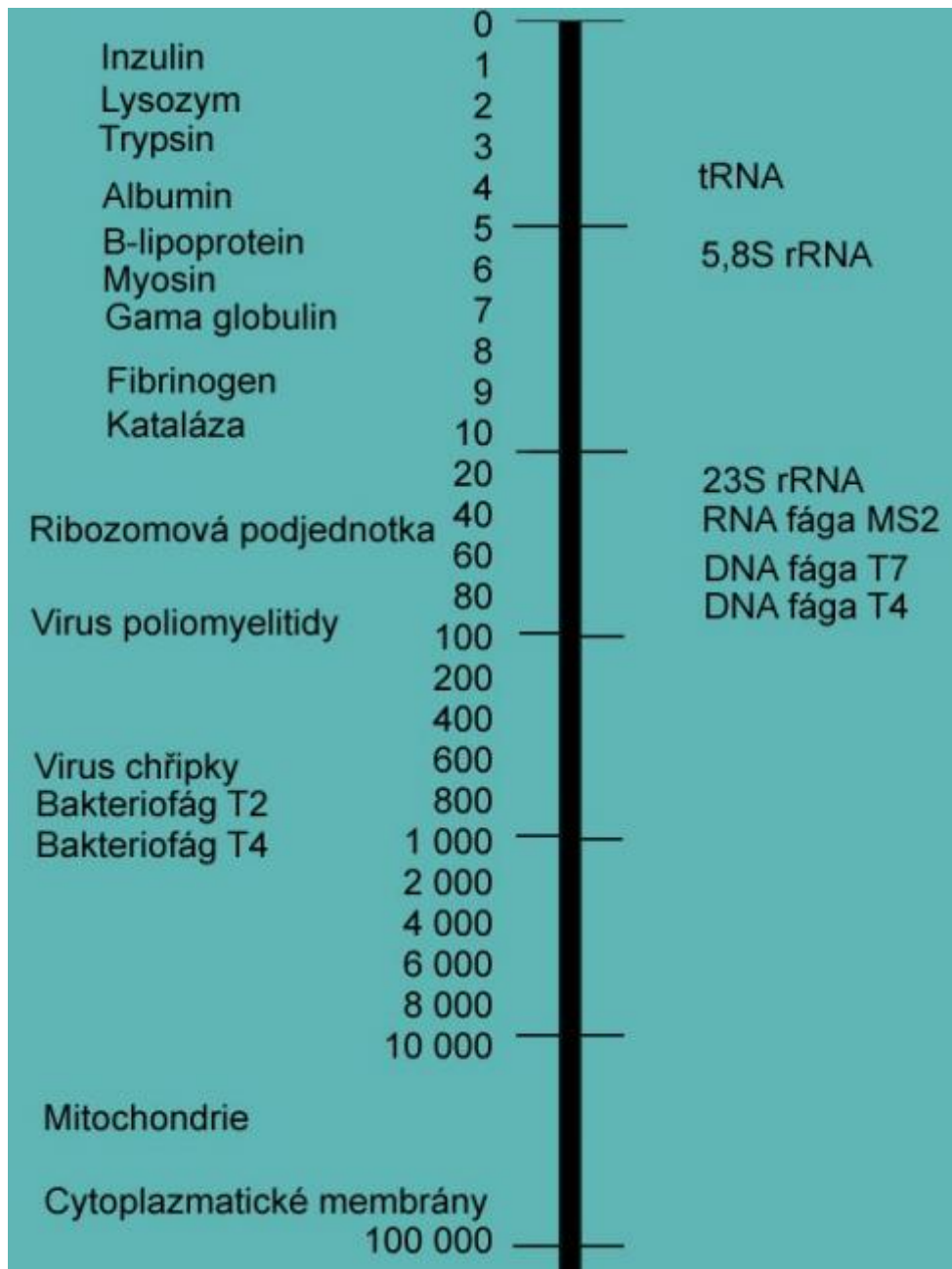
- charakterizace informačních makromolekul, buněčných organel apod. :  
hodnoty koeficientu se pohybují v rozmezí  $10^{-11}$  -  $10^{-13}$  s, proto se udává ve Svedbergových jednotkách: **1 S =  $10^{-13}$  sekundy**  
např. 30S =  $30 \times 10^{-13}$  s (dále 23S RNA, 16S RNA, nebo ribozom. podjednotky 30S, 50S)

# Vznášivá hustota

= hustota stanovená izopyknickou centrifugací, částice se nacházejí v oblasti, kde je hustota roztoku stejná jako hustota částic

## Využití:

- separace různých forem DNA  
- dále výpočet % (G+C): je známo, že na vznášivou hustotu dsDNA má vliv zastoupení jednotlivých typů párů bází, čehož se využívá ke stanovení podílu GC-párů ve vzorcích DNA;  
platí: % (G+C) =  $(\rho - 1,660/0,098) \cdot 100$



## ultracentrifuga Beckman Optima XPN-90







CAUTION - USE

INSTRUMENTS CLASSIFIED H, R, S

SW 55 Ti  
55000 RPM  
S/N 14E 0511  
MADE IN IRELAND

 **CAUTION**  
ON BUCKET ROTORS (HOOK-ON TYPE)  
MAKE CERTAIN BOTH HOOKS ARE  
ENGAGED.  
334244-8

SW55Ti

SW55Ti

SW55Ti

SW55Ti

SW55Ti

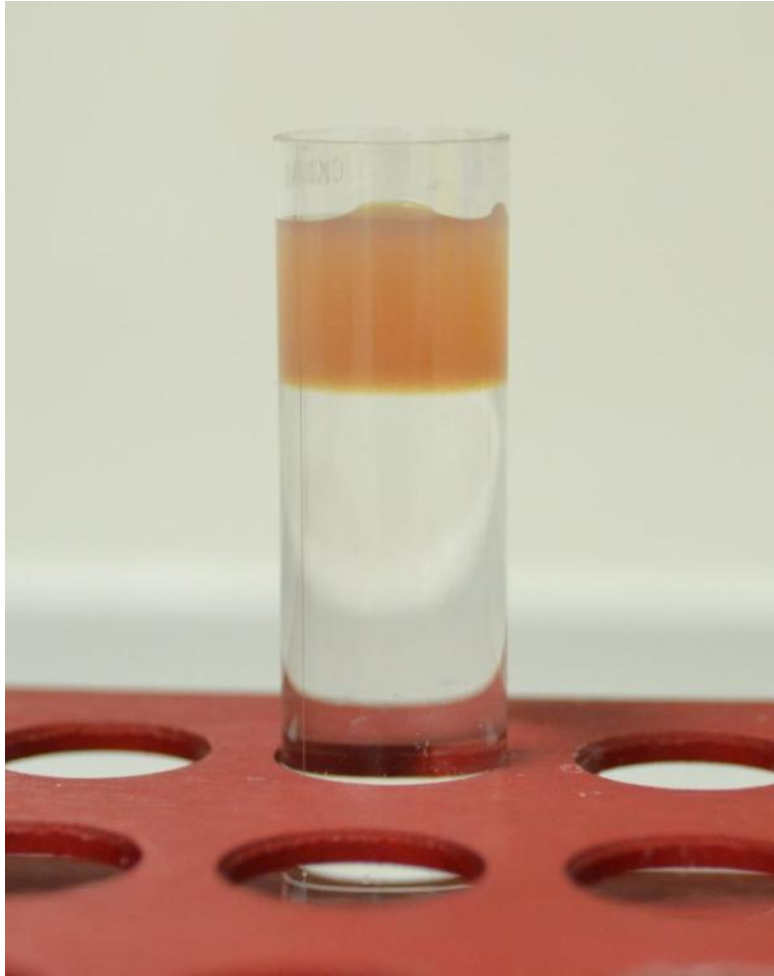
SW55Ti

BECKMAN  
COULTER  
331513

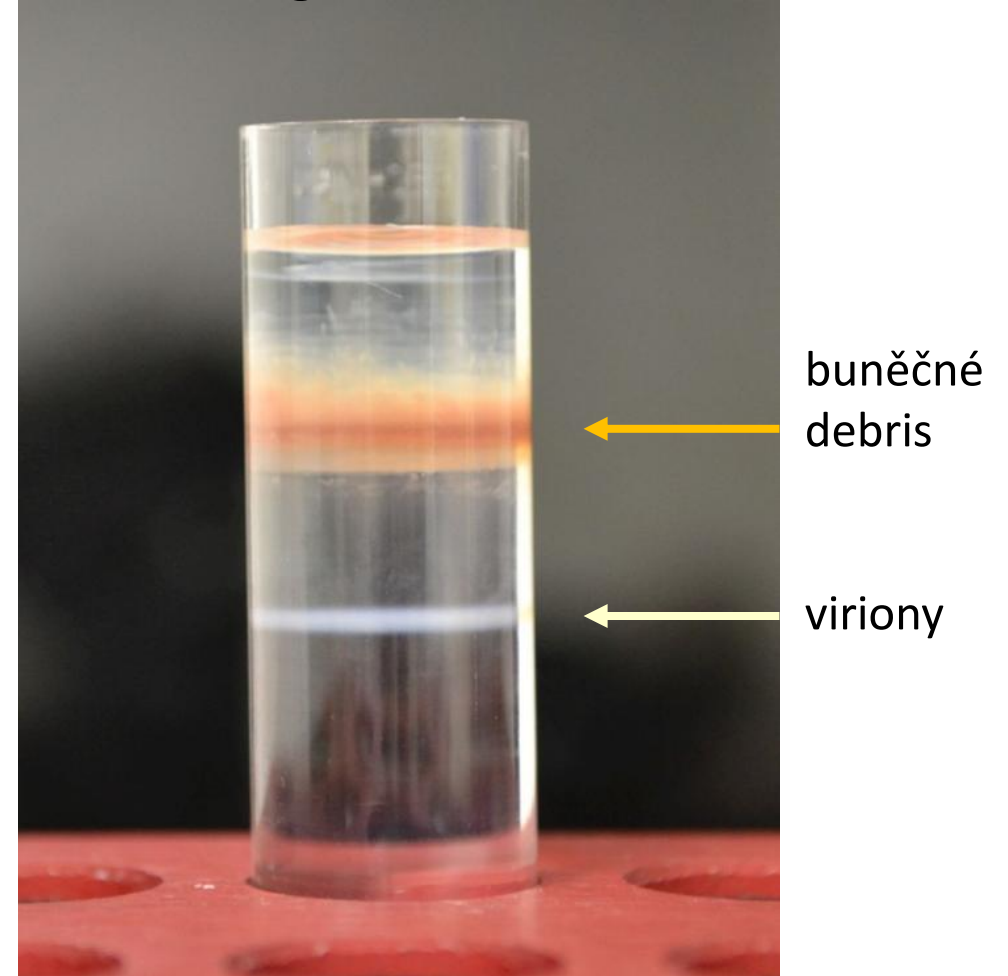


## Centrifugace zakoncentrovaného fágového lyzátu v gradientu CsCl

Před centrifugací



Po centrifugaci



buněčné  
debris

viriony