

## Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Znalost přesné koncentrace DNA je podmínkou úspěšného provedení řady molekulárněbiologických metod, jako transformace, transfekce, enzymové reakce s DNA při štěpení restrikčními endonukleázami a klonování, mapování, sekvencování a pod.

Spektrofotometrické stanovení 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:

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

kde  $I_0$  je množství vcházejícího světla a  $I$  je množství světla propuštěného. Nejpřesnější je stanovení absorbance v rozmezí od 0,1 do 1,0.

Při stanovení koncentrace DNA platí následující vztahy:

ds DNA	$A_{260} = 1$	odpovídá 50 $\mu\text{g/ml}$
ss DNA	$A_{260} = 1$	odpovídá 33 $\mu\text{g/ml}$
jednořetězcové 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 (tj. šířka kyvety). Jako rozpouštědla se při spektrofotometrickém stanovení koncentrace DNA používá obvykle destilované vody, TE pufru, SSC pufru nebo fosfátového pufru.

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:

$$A_{280}/A_{260} = 0,550 \quad A_{260}/A_{280} = 1,80 \text{ až } 1,85$$

$$A_{230}/A_{260} = 0,455 \quad A_{260}/A_{230} = 2,20$$

Pro čistou RNA platí poměr:  $A_{260}/A_{280} = 2,0$ .

Při kontaminaci preparátu proteiny jsou vypočtené poměry absorbancí výrazně nižší a koncentraci DNA nelze přesně stanovit. Stupeň znečištění DNA lze posoudit rovněž proměřením absorbance vzorku v rozsahu vlnových délek 230 - 300 nm a vyhodnocením získané křivky.

V případě silného znečištění DNA je třeba provést její přečištění. Podle toho čím je DNA znečištěna použije se některý z níže uvedených postupů:

- 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.

## Stanovení koncentrace DNA fluorescenční metodou

Metoda se používá u vzorků s nízkou koncentrací DNA a u vzorků znečištěných jinými látkami

Princip metody je založen na základě fluorescenčního záření emitovaného etidiumbromidem navázaným na DNA. Toto barvivo interkaluje mezi báze v dvouřetězcové DNA a po ozáření UV světlem silně fluoreskuje (asi 80x intenzivněji než volné barvivo). Srovnáním intenzity záření (o vlnové délce 590 nm) emitovaného testovaným vzorkem DNA a vzorkem standardní DNA o známé koncentraci lze stanovit koncentraci neznámého vzorku DNA. Tímto způsobem lze zjistit množství 1 - 5 ng DNA.

### **Upozornění !**















Etidiumbromid je silný mutagen. Při práci s jeho roztoky je nutné pracovat v rukavicích a dodržovat zásady bezpečnosti!

### Postup:

Vzorek DNA o neznámé koncentraci naředíme v TE-pufu ve sterilních mikrozkušavkách **10x, 50x, 100x, 1 000x, 10 000x** a **100 000x**. Z jednotlivých ředění odebereme automatickou pipetou 5  $\mu$ l a přeneseme je na parafilm, kde se vytvoří malá kapka. K této kapce přidáme 5  $\mu$ l roztoku etidiumbromidu (2  $\mu$ g/ml v TE-pufu) a špičkou pipety oba roztoky promícháme.

Paralelně ke kapkám vzorku připravíme stejným způsobem kapky standardního vzorku DNA se známou koncentrací. Parafilm s kapkami přeneseme na povrch transiluminátoru (**2UV<sup>TM</sup> Transilluminator, UVP,UK**) 302 a 365 nm) a srovnáváme intenzitu fluorescence. Lze pořídit fotografický snímek a odečíst výsledek.

### Schema pokusu:

ŘEDĚNÍ	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Standard (DNA)	0	10x	50x	100x	1 000x	10 000x	100 000x
Vzorek (DNA)	0	10x	50x	100x	1 000	10 000x	100 000x
EB ( $\mu$ l)+DNA ( $\mu$ l)	5 + 5	5 + 5	5 + 5	5 + 5	5 + 5	5 + 5	5 + 5
Zdroj UV (nm)	302	302	302	302	302	302	302
Standard+EB(10 $\mu$ l)							
Vzorek+EB (10 $\mu$ l)							

## Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Každý restrikční enzym vyžaduje optimální reakční podmínky, které jsou uváděny výrobcem v katalogu nebo jsou uvedeny v literatuře. Hlavní faktory, které výrazně ovlivňují rychlost a specifčnost štěpení, jsou teplota a složení reakčního pufru. Zatímco požadavky na teplotu jsou většinou dosti vyhraněné, rozdíly ve složení pufrů bývají často malé. Proto lze pro určitou skupinu restrikčních enzymů používat stejného pufru. Podle složení restrikčních pufrů lze enzymy rozdělit do tří základních skupin, a to na enzymy které pracují při nízké, střední a vysoké iontové síle pufru. Složení těchto pufrů je následující:

Pufr	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

Obvykle jsou výše uvedené pufrы připravovány jako 10× koncentrované zásobní roztoky, které se skladují při -20 °C.

### Provedení vlastního štěpení DNA

Reakce se obvykle provádí s 0,2 - 1 µg DNA v celkovém objemu 20 µl reakční směsi.

#### Postup:

1. Roztok DNA smíchat ve sterilní Eppendorfově zkumavce se sterilní destilovanou vodou tak, aby množství DNA bylo 0,2 - 1 µg a celkový objem 18 µl.
2. Přidat 2 µl příslušného 10× koncentrovaného restrikčního pufru a dobře promíchat.
3. Přidat jednu jednotku restrikčního enzymu a dobře promíchat.  
Jednotka enzymu je obvykle definovaná jako množství enzymu vyžadované pro rozštěpení 1 µg DNA kompletně během jedné hodiny v doporučeném pufru a při doporučené teplotě v 20 µl reakční směsi.
4. Inkubovat po příslušnou dobu za příslušné teploty.
5. Zastavit reakci přidáním 0,5 M EDTA do konečné koncentrace 20 mM. Reakci lze zastavit rovněž zahřátím reakční směsi na 65 °C po dobu 10 min. Pokud má být DNA analyzována přímo na gelu, přidat nanášecí barvivo (5:1) na nanést na gel.
6. Jestliže štěpená DNA má být purifikována, extrahovat 1× fenol: chloroformem, 1 × chloroformem a vysrážet DNA etanolem.

### Poznámky k práci s restrikčními enzymy

Restrikční enzymy jsou drahé, proto je třeba dodržovat následující pravidla:

1. Restrikční enzymy jsou stabilní při -20 °C, proto s nimi mimo tuto teplotu manipulujeme co nejkratší dobu a v ledové lázni.
2. Odběr požadovaného množství provádíme vždy novou sterilní špičkou. Kontaminace enzymu vede k jeho degradaci.
3. Často je možné množství enzymu vyžadovaného pro štěpení snížit a prodloužit dobu štěpení.
4. Pokud má být DNA štěpena dvěma nebo více enzymy, lze štěpení provést současně (pokud reakční pufr pro oba enzymy je stejný), nebo následně: nejdříve enzym vyžadující nízkou iontovou sílu, pak koncentraci pufru upravit a provést štěpení dalším enzymem.
5. Jestliže je prováděno štěpení mnoha vzorků DNA, vypočtete celkové potřebné množství enzymu. Odeberte toto množství a smíchejte s příslušným restrikčním pufrem. Rozplňte příslušné díly do jednotlivých reakčních směsí.
6. Jestliže objemové množství DNA je vyšší než kapacita jamky v gelu, je možné DNA zkoncentrovat etanolem a rozpustit v TE pufru.

## Restrikční endonukleázy (zkr. restriktázy, RE)

sekvenčně specifické endonukleázy štěpící fosfo-diesterovou vazbu dsDNA v určité sekvenci nukleotidů

**Původ:** Převážně produkty bakterií. V současné době je známo více než 3000 restriktáz, které rozpoznávají cizorodé DNA v 150 různých sekvencích

### Názvosloví:

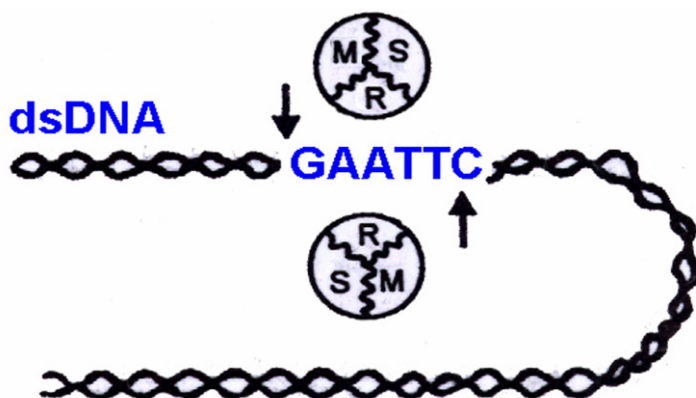
např. **EcoRI**

- **1. písmeno:** počáteční písmeno **rodu** produkční bakterie (kurzíva)
- **2. a 3. písmeno:** první dvě písmena **druhu** produkční bakterie (kurzíva)
- označení **kmene (serotypu)** produkční bakterie (ne vždy)
- římská číslice vyjadřuje **pořadové číslo** endonukleázy izolované z dané bakterie

**Funkce:** odbourávání cizorodé DNA (např. DNA fágů)

Typy RE : I, II a III

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



Výsledek štěpení: RE-fragmety DNA různé velikosti

3 typy RE-fragmentů:

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

**IZOSCHIZOMERY:** různé RE, které mají stejné cílové sekvence (odlišní producenti, většinou stejná reakce). Izoschizomery mohou mít odlišnou citlivost k metylovaným bazím v cílové sekvenci

**IZOKAUDAMERY:** Různé RE, které mají odlišné cílové sekvence, ale vytvářejí stejné lepivé konce. To je výhodné pro cílené spojování různých molekul DNA.

**EcoRI** má relaxovanou specifitu (může štěpit DNA v blízkce příbuzných sekvencích při neoptimálních podmínkách)

5`GAATTC 3`

5`GGATTC 3`

5`GGATTT 3`

5`AGATTT 3`

## Restrikční enzymy se speciálními teplotami inkubace

<i>Acs</i> I	(50 °C)	<i>Bst</i> EII	(60 °C)
<i>Acy</i> I	(50 °C)	<i>Bst</i> XI	(45 °C)
<i>Apa</i> I	(30 °C)	<i>Dsa</i> I	(55 °C)
<i>Ban</i> I	(50 °C)	<i>Mae</i> I	(45 °C)
<i>Bcl</i> I	(50 °C)	<i>Mae</i> II	(50 °C)
<i>Bse</i> AI	(55 °C)	<i>Mae</i> III	(55 °C)
<i>Bsi</i> WI	(55 °C)	<i>Sfi</i> I	(50 °C)
<i>Bsi</i> YI	(55 °C)	<i>Sma</i> I	(25 °C)
<i>Bsm</i> I	(65 °C)	<i>Ssp</i> BI	(50 °C)
<i>Bsp</i> LU11	(48 °C)	<i>Swa</i> I	(25 °C)
<i>Bss</i> HII	(50 °C)	<i>Taq</i> I	(65 °C)

## Využití restričního štěpení:

RE-spektra, molekulární typizace

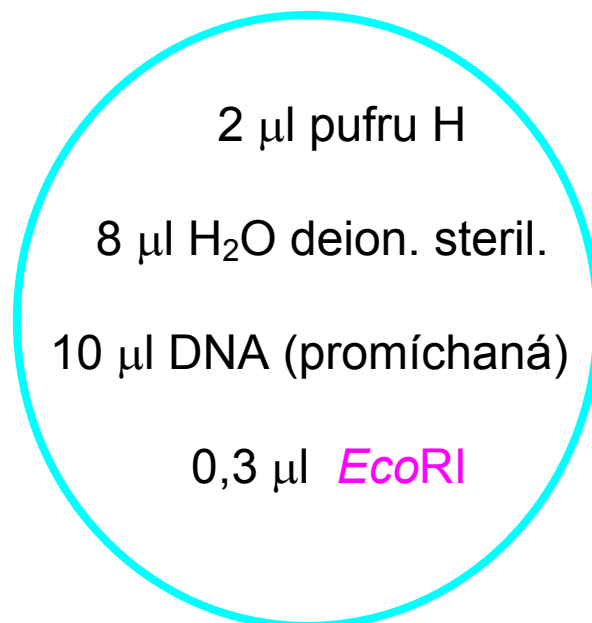
RE-fyzikální mapy

Molekulární sondy - hybridizační sondy

klonování

**Jednotka enzymu** = množství RE, které rozštěpí 1  $\mu\text{g}$  dsDNA (obvykle DNA fága  $\lambda$ ) za 1 hod. při optimální teplotě a optimálních podmínkách uvedených pro každou RE

### Příprava štěpící směsi – objem 20 $\mu\text{l}$



mžiková centrifugace 12 tis. rpm/ čas 0

inkubace při 37 °C 1,5 hod

zastavit reakci přidáním 0,8  $\mu\text{l}$  (0,5M EDTA)

Příklady několika restričních enzymů, jejich rozpoznávací sekvence a místa, ve kterých probíhá štěpení DNA

Restriktáza	Rozpoznávací sekvence 5'NNNNN3' 3'NNNNN5'
<b><i>Eco</i> RI</b> E. coli B 55	G AATTC CTTAA G
<b><i>Cla</i> I</b> Caryophanon latum	AT CGAT TAGC TA
<b><i>Apa</i> I</b> Acetobacter pasteurianus	GGGCC C C CCGGG
<b><i>Bst</i> EII</b> Bac. stearothermophilus	G GTNACC CCANTG G
<b><i>Hind</i> II</b> Haemophilus influenzae	GTPy PuAC CAPu PyTG
<b><i>Pvu</i> I</b> Proteus vulgaris	CGAT CG GC TAGC
<b><i>Pvu</i> II</b> Proteus vulgaris	CAG CTG GTC TAG
<b><i>Sma</i> I</b> Serratia marcescens	CCC GGG GGG CCC
<b><i>Acc</i> I</b> Acetobacter calcoaceticus	GT ATAC GT AGAC GT CTAC GT CGAC
<b><i>Ban</i> II</b> Bacillus aneurinolyticus	GAGCC C GAGCT C GGGCC C GGGCT C