

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 restrikcími 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.

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 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

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.

PCR - polymerázová řetězová reakce (princip metody)

PCR umožňuje získat požadovanou sekvenci bez klonování, navíc zcela specifickou. PCR využívá základních rysů replikace DNA:

Jako templát slouží ssDNA, podle níž je syntetizován komplementární řetězec.

K zahájení reakce je zapotřebí primer, který se připojuje na komplementární úseky DNA.

Tím je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován.

Jako templáty pro syntézu mohou sloužit oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.

Primery se vybírají tak, aby se připojovaly k místům ohraničujícím z obou stran amplifikovaný úsek. Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií), což vede k nesmírně rychlé amplifikaci původní molekuly.

Provedení reakce

Výchozím materiálem pro PCR je DNA obsahující sekvenci určenou k amplifikaci. Tuto sekvenci není nutné izolovat - výběr zajistí primery. Jako vzorek je možné použít i biologický materiál (DNA není nutné purifikovat).

Množství DNA jako výchozího materiálu je velmi nízké: obvykle postačuje méně než 1 mg genomové DNA, teoreticky postačuje jedna molekula.

Reakční směs obsahuje:

1. DNA 50 ng - 1 μ g
mikroorganismy, tkáňové kultury, tělní tekutiny, biotické vzorky, stěry, vlasy, atd.
2. Primery. Primery pro PCR mívají velikost 10 - 40 bp s obsahem GC mezi 40% - 70%. 3' konec primeru nesmí být komplementární k žádné části sebe sama (self-complementarity). Primer nesmí obsahovat palindromy a tvořit stabilní sekundární struktury. Oba primery by měly mít přibližně stejný obsah GC a podobnou teplotu annealingu (T_a). K navrhování primerů se používají počítačové programy, z nichž některé jsou volně dostupné.
3. dNTP ve formě Na nebo Li solí, koncentrace v reakci je 0,1 - 0,2 mM.
4. Mg^{+} ionty. Přítomnost Mg iontů v reakci je nezbytná, jejich množství závisí na množství DNA a dNTP v reakci. V jejich nepřítomnosti se netvoří žádný produkt, v nadbytku vznikají nespecifické produkty. Optimální koncentrace se stanovuje experimentálně pro každý pár primerů zvlášť.
5. DNA polymerázu
Taq *Thermus aquaticus*
Tth *Thermus thermophilus*
Tma *Thermotoga maritima*

Princip:

1. denaturace 95 °C (separace řetězců)
2. připojení primerů (30 - 65 °C) teplota určuje specifčnost a závisí na sekvenci primeru. $T_a = T_m - 5$ °C
3. polymerační reakce (65 - 75 °C)
4. nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus

Cyklické střídání teplot jednou založené směsi zajišťuje průběh reakce PCR, provádí se v termocyklerech, většinou se provádí 25 - 60 cyklů. Jako polymeráza se používá *Taq* DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotě 94 °C.

Protokol PCR

Detekce genu pro:

Režim termocykleru:

Složky reakční směsi	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství přidané do 25 μ l 1 vzorek	Množství přidané do μ l vzorků
Deionizovaná sterilní H₂O				
Pufř pro PCR bez MgCl₂	10×	1×		
Pufř pro PCR s 15mM MgCl ₂				
MgCl₂	25 mM / 50 mM	1,5 mM		
dNTP	10× / 5 mM	1× / 200 μ M		
BSA / želatina				
Primer F	100 μ M / 10 μ M	0,4 μ M		
Primer R	100 μ M / 10 μ M	0,4 μ M		
Taq DNA-polymeráza	5 U μ l ⁻¹	1 U		
Templátová DNA		50 ng		