

jméno:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu a b c d (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 DNA

Nukleové kyseliny se v buňkách vyskytují ve formě asociátů s bílkovinami (nukleoproteinů). Prvním izolačním krokem při přípravě preparátů nukleových kyselin je důkladná destrukce tkání nebo buněk. Existuje celá řada postupů, kterými lze oddělit složky nukleoproteinu - bílkoviny a jednotlivé druhy nukleových kyselin. Separace nukleových kyselin a bílkovin bývá často prováděna pomocí detergentů (nejčastěji dodecylsíránem sodným - SDS) ještě před extrakcí nukleových kyselin z tkáně. Také extrahovaný nukleoprotein lze dodatečně podrobit deproteinaci - nejčastěji se používá fenol (který současně inhibuje nukleasy) nebo směs chloroformu a isoamylalkoholu. DNA se z roztoků naopak poměrně selektivně precipituje např. isopropanolem.

V této části úlohy bude provedena extrakce nukleoproteinů z bakteriálních buněk v přítomnosti dodecylsíránem sodným, 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 fosfoesterických vazeb), z nichž zejména purinové nukleotidy a nukleosidy dále snadno odštěpí 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 bílkovinami, je tvar charakteristického absorpčního spektra nukleových kyselin (s maximem při vlnové délce 260 nm) v přítomnosti bílkovin zkreslen, neboť i bílkoviny absorbují UV záření v této oblasti vlnových délek.

Přítomnost nukleových kyselin se však i ve spektru vzorku obsahujícího větší množství bílkoviny 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 vyizolované 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 2.

Postup izolace DNA by měl být natolik šetrný, aby nedocházelo k její **denaturaci** (rozpadu nativní dvouřetězové struktury). Sekundární struktura nukleové kyseliny silně ovlivňuje absorpci UV záření - u dvouřetězových nukleových kyselin (tzn. především DNA) jsou heterocyklická jádra bazí pravidelně uspořádána uvnitř dvoušroubovice a takto uspořádaná struktura absorbuje méně než neuspořádaná jednořetězová struktura (kromě většiny RNA se jako jednořetězová vyskytuje denaturovaná DNA). Při rozpadu dvoušroubovice a vzniku nahodilého uspořádání dochází ke vzrůstu absorpce 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 vyizolovaný preparát vlastnosti nativní DNA.

## D. Fotometrické stanovení DNA 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 (dvouřetězové) 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  $\mu\text{g/ml}$ .

Biopolymery záření nejen absorbují, ale také rozptylují. Tím zdánlivě roste hodnota jejich absorpce. Nejjednodušší korekce rozptylu záření vychází z představy, že hodnotu rozptylu (zdánlivé absorpce) změřenou v oblasti, kde biopolymer záření již neabsorbuje, lze odečíst od hodnot nepříliš vzdálené absorpční oblasti. Nukleové kyseliny již neabsorbují při vlnové délce 330 nm, jejich  $A_{330}$  je tedy hodnota rozptylu, zdánlivé absorpce, kterou lze odečíst od naměřených hodnot absorpce a tím provést korekci měření.

## PRAKTICKÁ ČÁST A. Izolace DNA

### Materiál a vybavení:

bakteriální buňky (1g vlhkého peletu)  
roztok EDTA-NaCl (0,15 mol.l<sup>-1</sup> EDTA + 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaCl, pH 8,0)  
roztok lysozymu (10 mg.ml<sup>-1</sup>)  
25% roztok sodiumdodecylsulfátu (SDS)  
5 mol.l<sup>-1</sup> 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 zchlaďte na okolní teplotu pod tekoucí studenou vodou, přidejte 1,2 ml 5 mol.l<sup>-1</sup> 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 rozpustíte 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<sup>-1</sup>)  
standardní roztok ribosy (0,02 mg. ml<sup>-1</sup>)  
standardní roztok DNA (1 mg. ml<sup>-1</sup> fyziologického roztoku)  
standardní roztok RNA (1 mg. ml<sup>-1</sup> fyziologického roztoku)  
roztok nukleoproteínu (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 nukleoproteínu*	

\*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 nukleoproteínu se zbarvením kontrolního vzorku (fyziologický roztok) a standardních roztoků ribosy, deoxyribosy, RNA a DNA. Uveďte, zda se zdařilo identifikovat přítomnost DNA ve vyizolovaném produktu:

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

### Materiál a vybavení:

roztok nukleoproteinu (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 vyizolovaného nukleoproteinu uloženým v počítači. **Měření provádějte v UV 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 bílkoviny.

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. Proměřte absorpční spektrum obou vzorků v oblasti vlnových délek 230 – 300 nm proti fyziologickému roztoku. Zapište absorbance 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 UV plastových kyvetách.**

### 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 bílkovin) ve vyizolovaném 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, bílkovin, nízkomolekulárních látek):

Uveďte absorbance při vlnové délce 260 nm:

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

Získaný výsledek vysvětlete:

## PRAKTICKÁ ČÁST D. Fotometrické stanovení DNA v UV oblasti

### Materiál a vybavení:

standardní roztok DNA (1 mg.ml<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>) 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 <sup>-1</sup> ]	A <sub>260</sub>	A <sub>330</sub>	A <sub>260</sub> korigovaná	
	zředěný standardní roztok DNA [ml]	zředěný neznámý vzorek DNA [ml]	fyziol. roztok [ml]					
1	0	0,0	2,5	0,000	0,000	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					∅ A <sub>260</sub> -korigovaná
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 vlnových délkách 260 a 330 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).

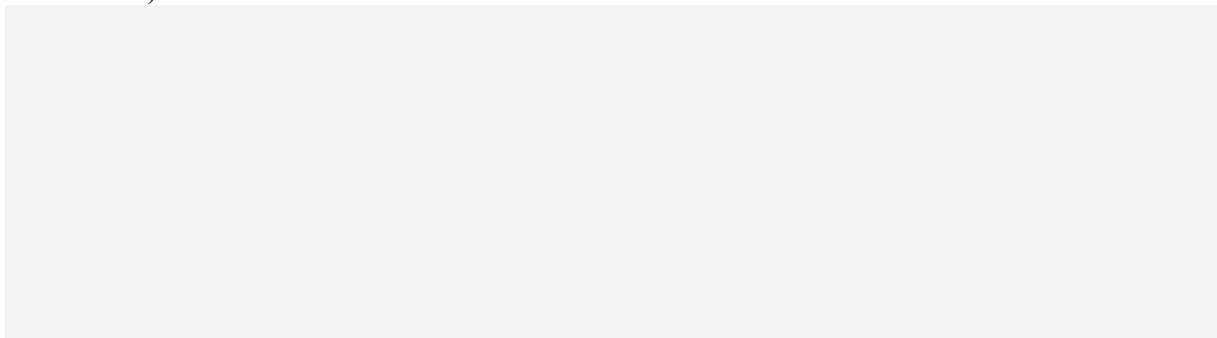
	koncentrace [mg.ml <sup>-1</sup> ]	A <sub>260</sub>	ε (uved'te fyzikální rozměr!)
ds-DNA			
ss-DNA			

### Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace DNA ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky. Tabulku dále doplňte korigovanými hodnotami  $A_{260}$  ( $A_{260}$ -korigovaná) vypočtenými podle vzorce:

$$A_{260\text{-korigovaná}} = A_{260} - A_{330}$$

Vypočítejte průměr absorbancí ve zkumavkách č. 7-8 a doplňte do tabulky. Sestrojte kalibrační graf (závislost  $A_{260}$ -korigovaná 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:  $\epsilon_{260}$   
(doplňte fyzikální rozměr) :

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

## KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:
<b>neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu</b> a b c d (zakroužkujte)	

### ÚLOHA 4C

A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>

A <sub>260</sub> – nativní vzorek	A <sub>260</sub> – denaturovaný vzorek

Podpis vedoucího cvičení:

### ÚLOHA 4D

zkumavka č.	A <sub>260</sub>	A <sub>330</sub>
1	0,000	0,000
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

	koncentrace [mg.ml <sup>-1</sup> ]	A <sub>260</sub>
ds-DNA		
ss-DNA		

Podpis vedoucího cvičení: