

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra biofyziky



Zavedení a optimalizace metody pro studium teplotní stability DNA

Bakalářská práce

Autor:	Eva Valterová
Studijní obor:	Biofyzika
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Děkuji své vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala při psaní mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za ochotu a pomoc. Bakalářská práce vznikla za finanční podpory projektu IGA_PrF_2016_013.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením prof. RNDr. Jany Kašpárkové, Ph.D., a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

Eva Valterová

Abstrakt

Teplotní stabilita DNA se mění v závislosti na mnoha faktorech, jako je například koncentrace iontů v roztoku nebo navázání biologicky aktivní látky komplexu na nativní formu DNA. Zjištění teploty tání proto můžeme využít při testování biologického působení látek interagujících s DNA. Cílem této práce bylo sestavit a optimalizovat aparaturu vhodnou k měření teploty tání DNA. K sestavení aparatury bylo využito zařízení dostupné v laboratoři Univerzity Palackého v Olomouci. Výsledky naměřené námi sestrojenou aparaturou byly srovnány s komerčně dostupným zařízením k měření teploty tání DNA. Bylo zjištěno, že hodnoty naměřené sestavenou aparaturou mají přibližně stejnou přesnost jako hodnoty komerčně dostupného zařízení, se kterými jsme je srovnávali. Podařilo se nám tedy sestavit aparaturu, která je plně funkční a lze ji použít k měření teploty tání vzorků DNA.

Abstract

The thermal stability of DNA depends on many factors, e.g. the concentration of ions in the solution or binding of compounds of biological significance to the native form of DNA. The determination of the melting point of DNA can be exploited for testing of biological action of the compounds interacting with DNA. The aim of the thesis was to setup and optimize an apparatus suitable for measuring of the melting point of DNA. The apparatus was constructed from the equipment available in the laboratory at the Palacky University in Olomouc. The results obtained with the aid of this apparatus were compared with the commercially available device designed for measurements of the melting point of DNA. We have found out that accuracy of the values obtained using our apparatus is approximately the same in comparison with the values obtained using the commercially available device. In conclusion, we have succeeded in assembling a functional apparatus, which may be used to measure the melting point of DNA samples.

Seznam zkratek

AT pár	adenin-thyminový pár bází
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GC pár	guanin-cytosinový pár bází
PCR	polymerázová řetězová reakce

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Teoretická část	2
2.1 Struktura nukleových kyselin.....	2
2.1.1 Primární struktura nukleových kyselin	2
2.1.2 Sekundární struktura nukleových kyselin	4
2.1.3 Terciální a kvartérní struktury DNA.....	6
2.2 Síly stabilizující DNA	6
2.3 Tání DNA.....	7
2.3.1 Tání krátkých fragmentů DNA	7
2.3.2 Tání dlouhých fragmentů a vysokomolekulární DNA.....	8
2.4 Postupy pro výpočet teploty tání DNA	8
2.5 Metody měření teploty tání DNA	9
2.5.1 UV spektrofotometrie.....	9
2.5.2 Diferenční skenovací kalorimetrie	10
2.5.3 Další metody	11
3 Cíl práce	12
4 Materiál a metody	13
4.1 Použité chemikálie	13
4.2 Přístroje a materiál	13
5 Výsledky a diskuze	15
5.1 Propojení aparatury	15
5.2 Rozdíl mezi teplotou lázně a teplotou kyvety	15
5.3 Vlastní měření	17
5.3.1 Příprava	17
5.3.2 První pokusné měření.....	17

5.3.3 Měření závislosti absorbance na změně teploty	18
5.4 Měření teploty tání DNA pomocí spektrofotometru Cary 4000	21
5.4.1 Příprava.....	21
5.4.2 Měření závislosti absorbance na změně teploty	21
5.5 Porovnání výsledků	23
6 Závěr.....	24

1 Úvod

Charakteristická struktura DNA byla objevena poměrně nedávno a to v roce 1953 Watsonem a Crickem. Bylo také zjištěno, že její stabilita je ovlivněna silami, které na ni působí. Mezi tyto stabilizující síly patří také vodíkové můstky spojující jednotlivé báze. Pokud zaniknou, dojde k denaturaci a původní dvoušroubovice se rozdělí na dva samostatné polynukleotidové řetězce. Tento jev může zapříčinit například změna koncentrace iontů v roztoku nebo zvýšení teploty. Za teplotu tání označujeme hodnotu teploty, při které je rozdělena právě jedna polovina bází, spojených původně vodíkovými můstky. Denuraci lze experimentálně pozorovat pomocí měření absorpance v závislosti na změně teploty. Znalost teploty tání může být podstatná při vyhodnocování mnoha experimentů. Její hodnota se mění v závislosti na změně stability molekuly. Ta může být zapříčiněna například navázáním komplexní sloučeniny na nativní formu DNA. Z tohoto důvodu je dobré umět změřit teplotu tání. Ne vždy však máme v laboratoři k dispozici automaticky pracující zařízení pro měření teploty tání DNA. Je proto výhodné umět sestavit aparaturu z dostupného vybavení. Denaturovanou DNA lze taky využít k dalším experimentům nebo například k polymerázové řetězové reakci (PCR – polymerase chain reaction).

2 Teoretická část

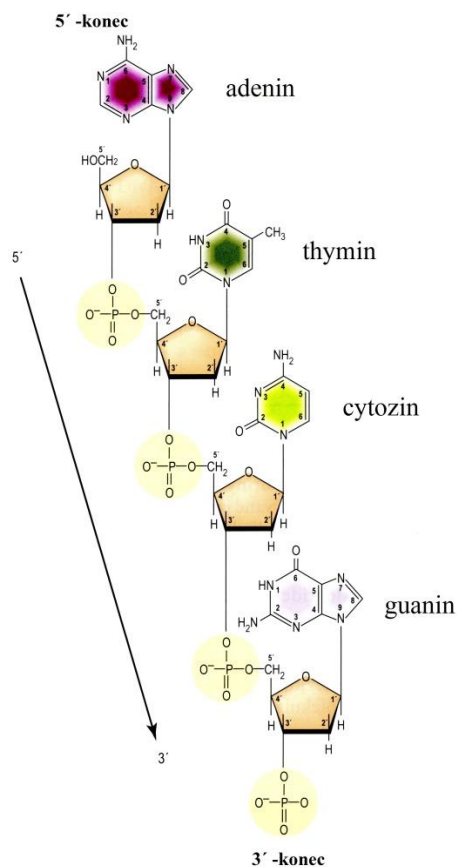
2.1 Struktura nukleových kyselin

2.1.1 Primární struktura nukleových kyselin

DNA neboli deoxyribonukleová kyselina se primárně skládá z polynukleotidového cukr-fosfátového řetězce, na který jsou navázány dusíkaté báze.

Polynukleotidový řetězec

Cukernou složku řetězce tvoří monosacharid 2-deoxy-D-ribóza. Na první uhlík 2-deoxy-D-ribózy je navázána jedna z dusíkatých bází. Třetí a pátý uhlík je vázán fosfodiesterovou vazbou na zbytek kyseliny trihydrogen fosforečné. Základní jednotkou DNA je tedy nukleotid, složený z dusíkaté báze, cukerné složky a fosfátové skupiny (Obrázek 2.1).

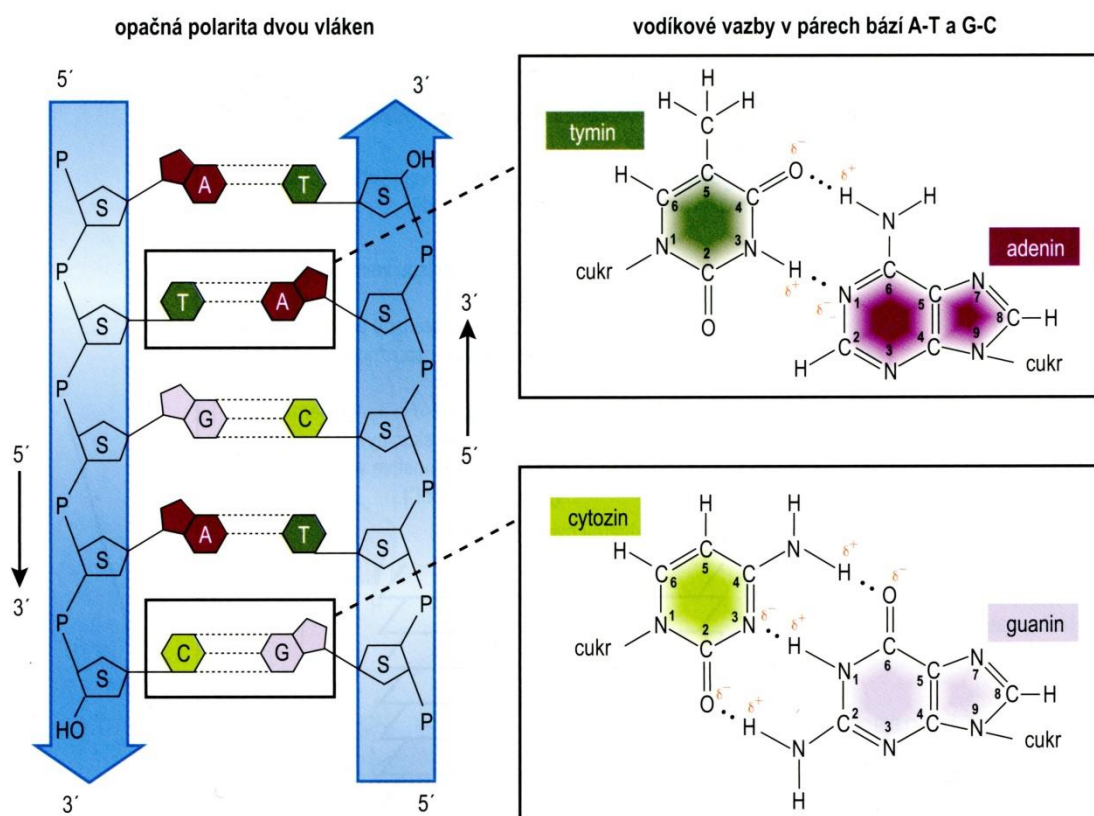


Obrázek 2.1: Stavba polynukleotidového řetězce (Snustad a Simmons, 2009 – upraveno)

Orientace řetězce se značí pomocí čísel 5' a 3' volných uhlíků deoxyribózy na konci řetězce. Vlákno se prodlužuje kondenzační reakcí mezi nukleosidtrifosfátem a 3'-koncelem řetězce (Hrazdilová, 2011).

Párování bází

Dusíkaté báze můžeme podle stavby rozdělit na purinové (adenin, guanin) a pyrimidinové (cytosin, thymin) (Kočárek, 2008). V některých organismech je cytosin nahrazen 5-methylcytosinem nebo 5-hydroxymethylcytosinem (Kalous a Pavlíček, 1980). Báze jsou navzájem komplementární. Adenin je vždy spojen s thyminem pomocí dvou vodíkových můstků a cytosin s guaninem jsou propojeny třemi vodíkovými můstky (Obrázek 2.2). Podle Chargaffova pravidla je poměr zastoupení adeninu s thyminem v řetězci vždy 1:1, stejně jako poměr cytosinu a guaninu. Jeden polynukleotidový řetězec DNA určuje pořadí bází druhého řetězce.



Obrázek 2.2: Párování bází (Snustad a Simmons, 2009)

Jednotlivé sekvence bází kódují genetickou informaci, která je přenášena molekulou DNA. Polynukleotidové řetězce jsou vázány antiparalelně vzhledem k jejich orientaci. Jeden je orientován ve směru 5' → 3' a druhý ve směru 3' → 5'.

2.1.2 Sekundární struktura nukleových kyselin

Dvoušroubovice DNA

Vzájemně spojené antiparalelní řetězce tvoří v prostoru sekundární útvar - dvoušroubovici o průměru 2 nm (Kalous a Pavlíček, 1980). Tento strukturní model poprvé navrhli v roce 1953 Watson a Crick na základě rentgenometrických snímků R. Franklinové (Kočárek, 2008). Páteř dvoušroubovice tvoří cukr-fosfátový řetězec, zatímco báze jsou orientovány do středu šroubovice, směrem k její ose. Směr vinutí dvoušroubovice rozlišujeme podle pravidla pravé ruky na pravotočivou a levotočivou dvoušroubovici.

Konformace B, A a Z

Existují tři formy konformací DNA, které se od sebe liší úhlem mezi rovinami obou bází (diedrální úhel), nachýlením bází od kolmice k ose a počtem nukleotidů na jeden závit dvoušroubovice (Tabulka 2.1).

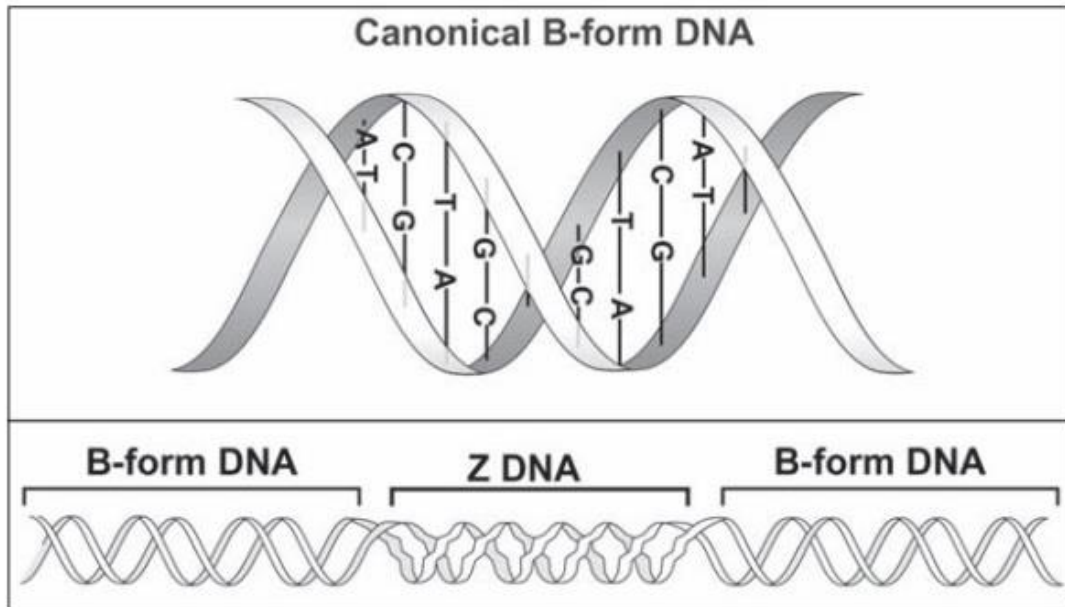
Tabulka 2.1: Rozdíly v konformacích DNA (Ohyama, 2005)

Forma	Počet párů bází na závit	Odchylka od kolmice k ose dvoušroubovice (úhlové stupně)
B	10,5	-6
A	11	20
Z	12	7

Jednou z nich je B-DNA, která je pravotočivě vinuta. Je to nejběžnější typ konformace (Ohyama, 2005), který odpovídá modelu dvoušroubovice Watsona a Cricka. V jednom závitu obsahuje 10,5 párů bází, které jsou soustředěny u osy dvoušroubovice. B-DNA je vhodná při různých vnějších podmínkách, jelikož je stabilní i při vysoké relativní vlhkosti (95%). V takových podmínkách ji obklopuje vodní obal z asociovaných molekul vody. B-DNA přechází do konformace A dehydratací.

A-DNA je pravotočivě vinuta a každý její závit je složen z 11 párů bází. Báze jsou soustředěny dále od osy dvoušroubovice než u B-DNA. Konformace A potřebuje pro svou existenci vhodné prostředí, které lze vytvořit snížením obsahu vody nebo zvýšením koncentrace soli nebo organického rozpouštědla. Její hydrofobní síly jsou slabší než u konformace B a proto je stabilnější při nižší relativní vlhkosti (75%).

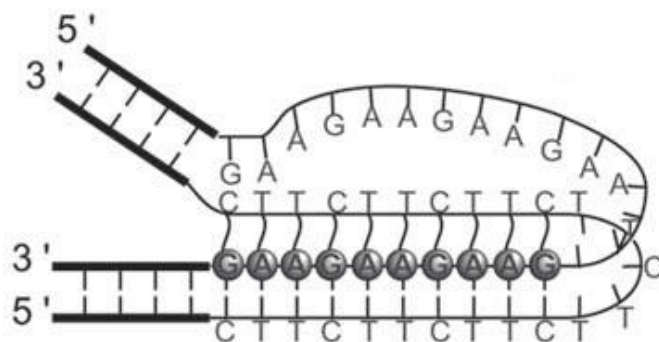
Konformace Z-DNA je vinuta levotočivě. Jeden závit obsahuje 12 párů bází. Klikatost a levotočivost způsobuje střídání bází. Při vysokém obsahu soli může úsek B-DNA přejít do konformace Z jestliže se v něm střídají purinové a pyrimidinové báze (Obrázek 2.3).



Obrázek 2.3: Přechod B-DNA do Z-DNA (Ohyama, 2005)

Neobvyklé struktury DNA

DNA nemusí být vždy uskupena jen v dvouvláknové struktuře, ale může tvořit triplex, který je složený ze tří vláken. Jednou z možností jeho vzniku je navázání jednoho polynukleotidového řetězce na dvouvláknovou DNA. Samotný polynukleotidový řetězec vznikne rozpletním dvoušroubovice. Trojvláknová DNA se tedy skládá z klasické dvoušroubovice popsané Watson-Crickovým modelem (B-DNA) a polynukleotidového vlákna navázaného Hoogsteenovským párováním (Hrazdilová, 2011). Jedním z triplexů je i takzvaná H-DNA, která vzniká rozpletním části dvoušroubovice. Jedno z volných vláken se poté stočí a naváže se zpět na dvoušroubovici (Obrázek 2.4).

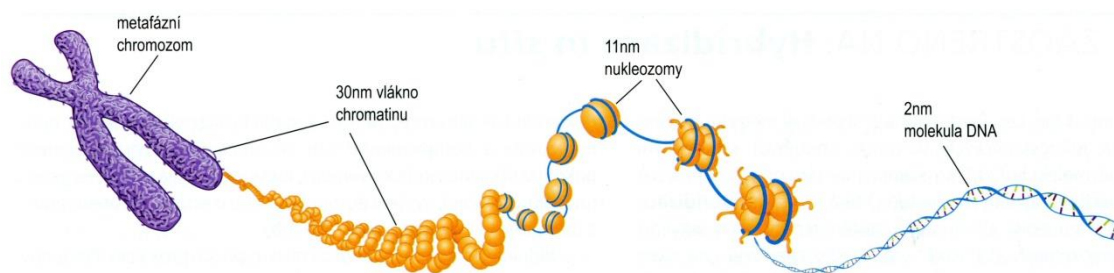


Obrázek 2.4: Triplex (Ohyama, 2005 - upraveno)

Existuje také čtyřvláknová DNA (kvadruplex). Nejčastěji se tvoří guaninové kvadruplexy.

2.1.3 Terciální a kvartérní struktury DNA

Dvoušroubovice se dále vine na histony, což jsou bazické nukleoproteiny. Osm histonů obalených vláknem DNA tvoří nukleozom, který je základní stavební jednotkou chromozomu. Vlákno s nukleozomy se dále stáčí do solenoidu. Ze solenoidů je pak složen samotný chromozom (Obrázek 2.5).



Obrázek 2.5: Terciální a kvartérní struktura DNA (Snustad a Simmons, 2009)

2.2 Síly stabilizující DNA

Síly stabilizující DNA dělíme na horizontální a vertikální vzhledem k ose dvoušroubovice (Bursová, 2007).

Mezi horizontální síly patří vodíkové můstky spojující navzájem komplementární báze. Adenin s thyminem jsou spojeny dvěma vodíkovými můstky a guanin s cytosinem třemi (Doktycz, 1997). Můstky spojují atom vodíku s kyslíkem, nebo s dusíkem. Síla

vazby závisí na vzdálenosti mezi atomy a na jejich parciálních náboji. Vodíková vazba je přibližně třicetkrát slabší než kovalentní vazba.

Vertikálně stabilizují DNA hydrofobní interakce, Londonovy disperzní síly a dipól-dipólová interakce. Jednotlivé příspěvky těchto sil jsou poměrně malé, ale díky jejich spojení vzniká stabilní molekula DNA. Londonovy disperzní síly vznikají fluktuací elektronové hustoty kolem jádra, což způsobuje vznik rychle proměnného dipólu, který se dále indukují. Takto vzniklé paralelní dipóly se navzájem přitahují. Londonovy disperzní síly rostou nepřímo úměrně se vzdáleností dipólů. Každá báze dvoušroubovice má svůj permanentní dipól, který přispívá k vertikálním přitažlivým silám mezi bázemi. Stabilita dvoušroubovice je tedy sekvenčně závislá. Další formou stabilizujících sil jsou hydrofobní interakce. Cukrfosfátová kostra dvoušroubovice je záporně nabitá, proto se v jejím okolí vytváří kladně nabitá iontová atmosféra, která přispívá ke stabilitě DNA.

2.3 Tání DNA

Při tání DNA zanikají vazby mezi řetězci dvoušroubovice a dochází k jejich oddělení. Jelikož stabilita DNA je sekvenčně závislá, bude tento děj záviset na struktuře fragmentu dvoušroubovice. Denuraci může způsobit zvýšení teploty, extrémní změna pH nebo extrémní snížení koncentrace iontů v roztoku (Bursová, 2007).

2.3.1 Tání krátkých fragmentů DNA

Při zvýšení teploty dochází k zániku vodíkových vazeb mezi bázemi a hydratačního obalu v důsledku tepelného pohybu molekul. Narušené jsou také interakce mezi bázemi nad sebou. Teplota tání DNA udává hodnotu teploty, při které je rozdělena právě jedna polovina komplementárních bází, spojených původně vodíkovými můstky. Tání je děj endotermický, což znamená, že k denuraci DNA je potřeba do soustavy dodat teplo. Dodáním tepla se zvyšuje celková entalpie. V důsledku rozdělení řetězců klesá uspořádanost soustavy. Roste tedy také entropie systému. Teplotu tání ovlivňuje struktura sekvence DNA jak počtem vodíkových vazeb mezi bázemi tak interakcí mezi bázemi nad sebou. Dále ji také může ovlivnit koncentrace DNA v roztoku a koncentrace kladných iontů. U krátkých fragmentů DNA lze teplotu tání dopočítat z termodynamických veličin za předpokladu, že jde o dvoufázový přechod. U delších fragmentů však už tato aproximace nebude stačit.

2.3.2 Tání dlouhých fragmentů a vysokomolekulární DNA

Tání dlouhých fragmentů nemůžeme aproximovat dvoustavovým kooperativním dějem jako u krátkých fragmentů (Kohoutková, 2006). V řetězci jsou nerovnoměrně rozmístěny guanin-cytosinové a adenin-thyminové páry, proto dochází k nespojitému tání. Řetězce se denaturují po oblastech. Každá oblast však taje najednou v úzkém rozmezí teplot. Oblasti s větší koncentrací AT párů tají při nižších teplotách než oblasti s větší koncentrací GC párů.

2.4 Postupy pro výpočet teploty tání DNA

Ke zjištění teploty tání DNA můžeme použít několik metod. Tání krátkých řetězců můžeme popsat jako dvoufázový přechod, při kterém zanikají vodíkové můstky mezi dvěma řetězci dvoušroubovice (AB) a vznikají dva samostatné polynukleotidové řetězce (A a B).



Tuto rovnici charakterizuje rovnovážná konstanta K , daná vztahem

$$K = \frac{[A][B]}{[AB]} . \quad (2)$$

Pomocí volné energie ΔG° , která je dána rovnicí

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{[A][B]}{[AB]} , \quad (3)$$

kde R je molární plynová konstanta a T je teplota, můžeme zjistit teplotu tání T_m ze znalosti původní koncentrace nukleové kyseliny $[AB]_{\text{původní}}$

$$T_m = - \frac{\Delta G^\circ}{R \ln \frac{[AB]_{\text{původní}}}{2}} . \quad (4)$$

Teplotu tání DNA můžeme také zjistit pomocí metody nejbližšího souseda. Ta je založena na výpočtu teplotní stability DNA ze známé primární struktury (Breslauer a spol., 1986). Uvažuje jak entalpii párové vazby mezi dvěma nukleotidy tak i síly mezi nejbližšími nukleotidovými páry.

Pokud nevyžadujeme příliš velkou přesnost výpočtu, můžeme využít poměrně jednoduchý, ale nepřesný vzorec

$$T_m = 2 \cdot AT + 4 \cdot GC , \quad (5)$$

kde AT značí počet AT párů a GC značí počet GC párů. Tento výpočet vychází z pozorování, že na denuraci jednoho AT páru je potřeba teplotu zvýšit o 2 °C a na GC pár o 4 °C. Tento výpočet můžeme však využít pouze pro fragmenty řetězce DNA o délce 20 až 40 bází.

Složitější metodou je metoda lineární regrese založena na znalosti procentuálního zastoupení GC párů v řetězci. Pro DNA z telecího brzlíku (dále thymu) je to 41,9 %. Poté můžeme vypočítat teplotu tání ze vzorce

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log_{10}[\text{Na}^+] + 0,41(\%GC) , \quad (6)$$

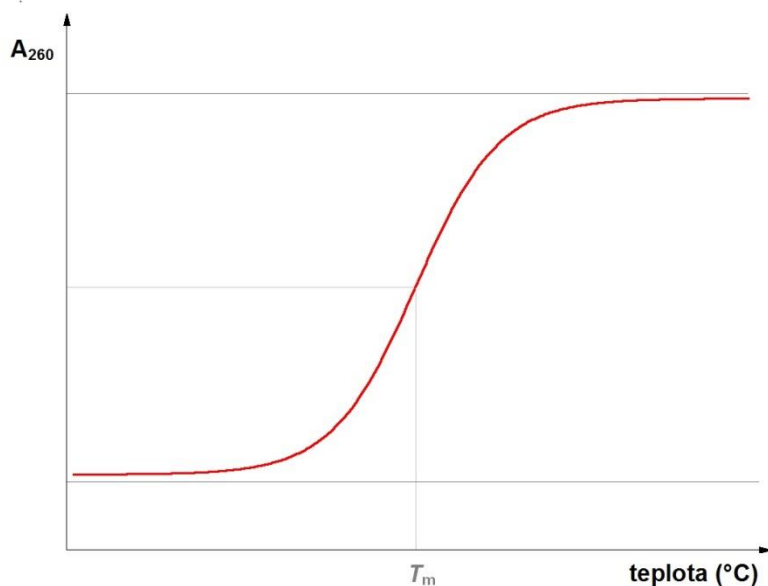
který vyjadřuje závislost teploty tání mimo jiné i na koncentraci sodných iontů v roztoku (Doktycz, 1987). Výsledná teplota tání DNA, vypočítaná pomocí vzorce (6), vyjde ve stupních celsia.

2.5 Metody měření teploty tání DNA

Často se využívá k určení teploty tání experimentální měření. Experimentálně lze teplotu tání neznámého vzorku DNA měřit hned několika způsoby.

2.5.1 UV spektrofotometrie

UV spektrofotometrie je založena na měření absorpce světla měřeným vzorkem. Absorpční maximum nukleových kyselin je při vlnové délce 260 nm (Kästner, 2011). Při tání DNA dochází k relativnímu zvýšení absorpce, což je označováno jako hyperchromní efekt (Sinden, 1994). Tohoto jevu využívá UV spektrofotometrie ke zjištění závislosti denaturace na teplotě. Pokud se jedná o krátký fragment DNA, má křivka závislost absorpce na teplotě sigmoidní tvar (Obrázek 2.6). Teplota tání je dána inflexním bodem sigmoidy.



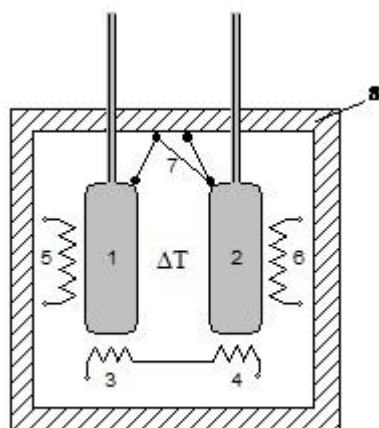
Obrázek 2.6: Sigmoidní tvar křivky s inflexním bodem T_m

Pomocí UV spektrofotometrie však nemůžeme přímo určit hodnotu změny entalpie, entropie a volné energie. Tyto veličiny lze dopočítat pomocí aproximace na dvoustavový přechod, což znamená, že řetězce jsou buď úplně odděleny, nebo kompletně spárovány. Tuto aproximaci můžeme však použít jen u krátkých řetězců DNA (Bursová, 2007).

2.5.2 Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie umožňuje na rozdíl od UV spektrofotometrie přímo měřit termodynamické parametry, jako jsou například fázové přechody a konformační změny.

Diferenční skenovací kalorimetr kontinuálně zaznamenává tepelnou kapacitu v závislosti na teplotě. Obsahuje dvě cely, umístěné v adiabatickém plášti. Obě cely jsou plnitelné kapilárami a jsou spojeny speciálním termočlánkem (Obrázek 2.7). Elektrickými topnými tělesy je teplota zvyšována nebo snižována v rozsahu od -10 do 100°C . Peltierovy články zajišťují ochlazování.



Obrázek 2.7: Schéma diferenčního skenovacího kalorimetru (1-cela se vzorkem, 2-referentní cela, 3, 4, 5, 6- elektrická topná tělesa, 7-čidlo zaznamenávající rozdíl teplot mezi celami, 8- adiamatický plášť)
(Bursová, 2007)

Jedna cela slouží jako referentní a do druhé cely se vkládá vzorek. Oběma celám je dodávána stejná energie, pokud však v cele se vzorkem probíhá endotermický děj (např. tání DNA) bude teplota cely nižší. Rozdíl teplot je zaznamenán čidly, které zajistí, aby chladnější cele bylo dodáno více energie. Za předpokladu, že známe koncentraci vzorku uvnitř cely, můžeme převést závislost elektrické energie na teplotě na závislost změny tepelné kapacity na teplotě.

Pomocí diferenční skenovací kalorimetrie lze také určit stupeň kooperativity tání řetězce.

2.5.3 Další metody

Další metody měřící teplotu tání DNA mohou být založeny na principu měření, zda je ve zkoumaném vzorku jednovláknová (denaturovaná) DNA nebo dvouvláknová DNA. To lze zjistit několika způsoby. Můžeme využít již zmíněnou UV spektrofotometrii, díky poznatku, že jednovláknová DNA má větší absorpenci, než původní dvoušroubovice. Dále můžeme použít elektroforézu, k separaci vzorku podle velikosti částic a poté vyhodnotit poměr mezi denaturovanou a nativní DNA. Ke zjištění teploty tání lze také využít specifické primery, popřípadě sondy, které jsou schopny navázat se pouze na nespárované báze.

3 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo sestavit aparaturu vhodnou k měření teploty tání DNA s využitím absorpční spektrofotometrie a najít optimální podmínky pro měření.

S využitím sestavené aparatury poté stanovit teploty tání konkrétních vzorků DNA a srovnat získané výsledky s hodnotami stanovenými s využitím komerčního zařízení, dostupného v Biofyzikálním ústavu AV ČR v Brně.

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

V experimentech byly použity tyto chemikálie:

- telecí thymová DNA (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- chloristan sodný – roztoky o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $0,0015 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
- minerální olej (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- destilovaná voda

4.2 Přístroje a materiál

Mezi přístroje a materiál využitý při sestavení aparatury patří:

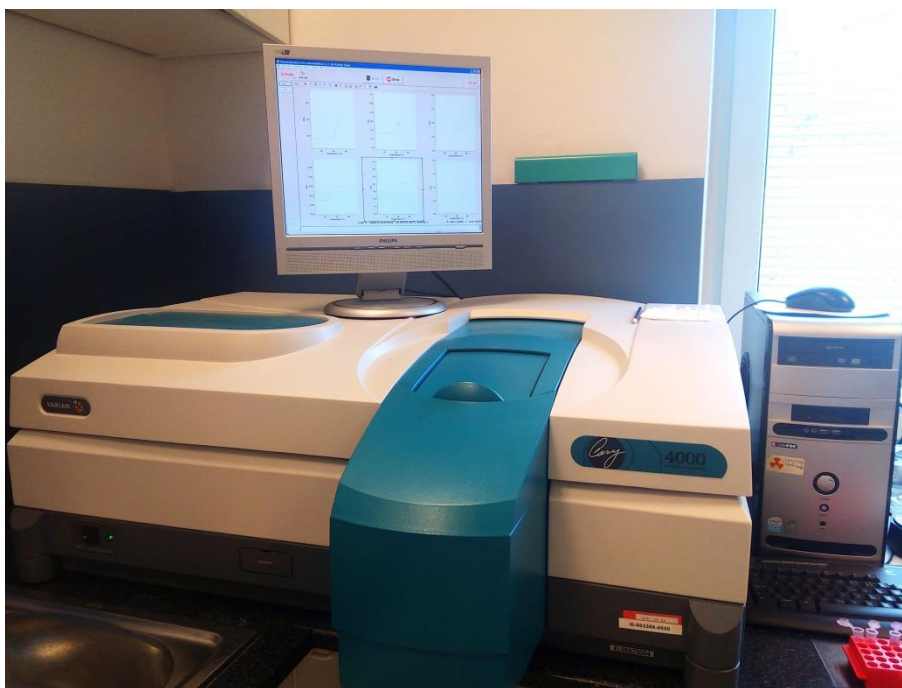
- vodní lázeň – Water bath 9106 (PolyScience, USA)
- spektrofotometr Helios β (UNICAM, USA)
- hadička silikonová – světlost 16 mm, vnější průměr 21 mm, síla stěny 2,5 mm (P-LAB, Česká republika)
- hadička silikonová – světlost 4 mm, vnější průměr 6 mm, síla stěny 1mm (P-LAB, Česká republika)
- spona hadicová – vnější průměr hadičky 18 – 20 mm (P-LAB, Česká republika)
- spona hadicová – vnější průměr hadičky 6 – 6,5 mm (P-LAB, Česká republika)
- redukce hadicová PP – nominální 4, 6, 8 / 12, 14, 16; trubička 3,2 až 7,6 / 10,2 až 15,5 mm; osazení 3,7 až 8,2 / 12,2 až 16,2; vnitřní průměr 2,0 / 7,8 mm; délka 86 mm (P-LAB, Česká republika)
- parafilm (Sigma-Aldrich s.r.o., Česká republika)
- alobal
- buničina
- kyvety
- teploměr Testo 922 (Testo AG, Česká republika)
- čidlo TE-K ponorné ohebné (Testo AG, Česká republika)
- vývěva vakuová recirkulační VacSafe 15 (LaboGene, Dánsko)

Cary 4000 UV-Vis

Srovnávací měření bylo provedeno spektrofotometrem Cary 4000 UV-Vis (Agilent technologies, USA). Tento přístroj můžeme považovat za automatizovanou aparaturu vhodnou pro měření teploty tání DNA. Jeho princip spočívá v měření absorbance vzorku za určité teploty. Teplota je snímána čidlem, umístěným v kovovém bloku, do kterého jsou vloženy kyvety se vzorky.

Ve vzorku s DNA dojde při zvýšení teploty k hypochromnímu efektu, z čehož lze jednoznačně určit teplotu tání daného vzorku DNA. Přístroj zaznamenává každou 1 minutu hodnotu absorbance při vlnové délce 260 nm. Hodnota teploty za tuto dobu vzroste o 0,4 °C. Teplotu jsme měřili v rozsahu od 25 do 95 °C.

Do kyvet určených pro měření T_m (Semi-micro rect cell, UV 10 mm, Agilent Technologies) jsme napipetovali 900 μ l vzorku. Poté byly kyvety vloženy do exsikátoru připojeného k vakuové vývěvě, kde došlo k odvzdušnění vzorku. V exsikátoru byly kyvety ponechány 15 minut a poté byly ze vzorků v kyvetách pomocí pipetovací špičky odstraněny bublinky plynu. Po uzavření kyvet teflonovými zátkami jsme kyvety se vzorky umístili do kyvetového bloku ve spektrofotometru a zahájili měření.



Obrázek 4.1: Cary 4000 UV-Vis

5 Výsledky a diskuze

5.1 Propojení aparatury

Aparatura byla sestavena z výše zmíněných komponentů (Obrázek 5.1). Na vývody vodní lázně byly připevněny silikonové hadice o vnějším průměru 21 mm pomocí hadicové spony určené pro vnější průměr hadice 18 – 20 mm. Spoj byl zaizolován parafilmem. Na druhý konec těchto hadic byly vloženy hadicové redukce, na které se dále napojily silikonové hadičky o vnějším průměru (\varnothing) 6 mm. Spoje na hadicové redukci byly rovněž zaizolovány parafilmem. Silikonové hadičky ($\varnothing = 6$ mm) byly upevněny druhým koncem na vývody kovového bloku spektrofotometru pomocí hadicové spony určené pro vnější průměr hadičky 6 – 6,5 mm. Spoj byl zaizolován parafilmem. V kyvetovém bloku byly umístěny kyvety se vzorky a jedna referenční kyveta, do které bylo umístěno čidlo snímající teplotu. Kyvety byly zavičkovány pomocí parafilmu.



Obrázek 5.1: Propojení aparatury

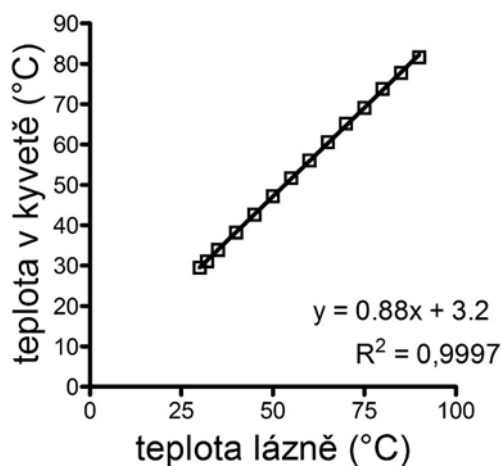
5.2 Rozdíl mezi teplotou lázně a teplotou kyvety

Před samotným měřením jsme se snažili zjistit, zda se teplota lázně shoduje s teplotou vzorku v kyvetě.

Po nastavení dané teploty lázně jsme počkali 10 minut a poté byla odečtena hodnota teploty v kyvetě. Teplota v lázni byla zvyšována po 5 °C, v rozmezí od 30 °C do 90 °C. Tabulka 5.1 a obrázek 5.2 shrnuje naměřené výsledky závislosti teploty v kyvetě na teplotě v lázni.

Tabulka 5.1: Závislost teploty roztoku v kyvetě na teplotě vodní lázně použité k ohřívání kyvetového prostoru

Teplota lázně (°C)	30,0	32,0	35,0	40,0	45,0	50,0	55,0	60,0	65,0	70,0	75,0	80,0	85,0	90,0
Teplota v kyvetě (°C)	29,5	31,1	33,9	38,2	42,6	47,2	51,7	56	60,6	65,2	69,1	73,8	77,7	81,6



Obrázek 5.2: Graf závislosti teploty roztoku v kyvetě na teplotě vodní lázně

Z naměřených hodnot (Obrázek 5.2) vyplývá, že teplota vodní lázně a teplota v kyvetě se neshodují. Rozdíl teplot se při vyšších teplotách navíc zvětšuje. Z tohoto měření je tak jasné, že je potřeba měřit teplotu přímo v kyvetě, umístěné v bloku spektrofotometru.

Abychom snížili teplotní rozdíl mezi lázní a kyvetou, zaizolovali jsme silikonové hadičky buničinou, kterou jsme obalili alobalem. Díky tomuto opatření se nám také podařilo dosáhnout vyšších teplot, než bylo před zaizolováním možno v kyvetě naměřit.

5.3 Vlastní měření

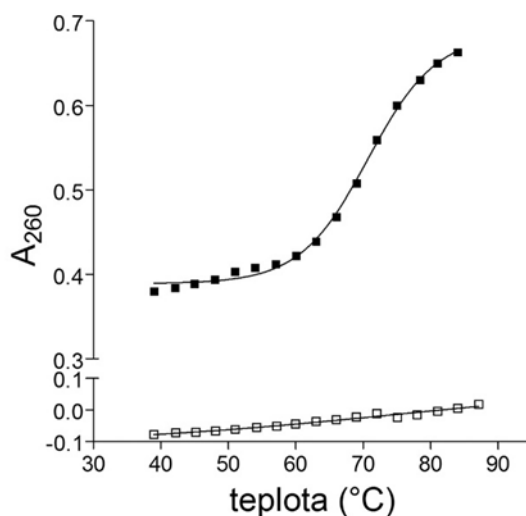
5.3.1 Příprava

Před samotným měřením jsme si ze zásobního roztoku thymové DNA o koncentraci $6,25 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ odpipetovali 3 μl a doplnili chloristanem sodným na výsledný objem 3 ml. Dosáhli jsme tak požadované koncentrace $6,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Do druhé kyvety byly odpipetovány 3 ml chloristanu sodného. Horní část kyvet jsme překryli parafilmem a kyvety jsme umístili do spektrofotometru.

Absorbance byla měřena při vlnové délce 260 nm. Teplota byla zvyšována od 30 °C do 90 °C vždy po 3°C. Po každém kroku byla odečtena hodnota absorbance.

5.3.2 První pokusné měření

První měření absorbance mělo zjistit, zda takto sestavenou aparaturou lze vůbec měřit teplotu tání a pokud možno co nejvíce eliminovat odstranitelné nedostatky. Obrázek 5.3 znázorňuje výsledek měření.



Obrázek 5.3: Závislost absorbance při 260 nm na teplotě vzorku. Označení: ■ - roztok thymové DNA v 0,01 molární NaClO₄, □ - 0,01 molární NaClO₄ (blank)

Po tomto měření bylo zjištěno, že vzorek v kyvetě se kvůli vysokým teplotám nadměrně odpařuje. Při odpaření se zvyšuje koncentrace DNA ve vzorku, což způsobuje zvýšení absorbance. Vzrůstající hodnoty absorbance tudíž nejsou zapříčiněny pouze denaturací DNA, ale i zvýšením její koncentrace. Z tohoto důvodu nemůžeme z těchto hodnot určit teplotu tání DNA.

Nadměrnému výparu vzorku jsme v dalším měření zamezili použitím minerálního oleje, kterým jsme zakáplli roztok DNA v kyvetě. Tohoto oleje bylo aplikováno 200 μl .

Během tohoto měření jsme zjistili, že je v průběhu měření potřeba odstraňovat bublinky ze vzorku lehkým poklepáním. Tyto bublinky rovněž způsobují nežádoucí růst absorbance.

5.3.3 Měření závislosti absorbance na změně teploty

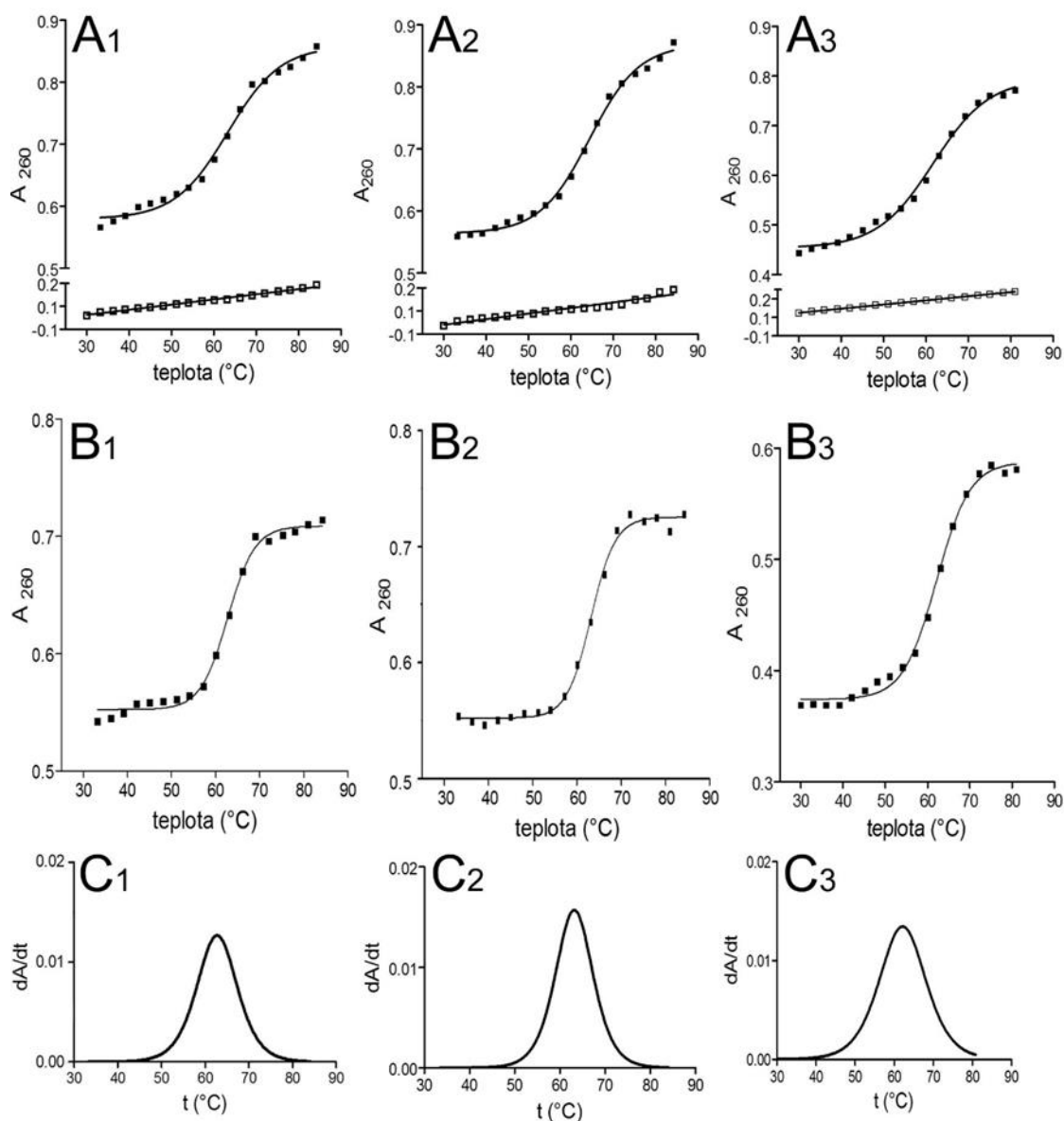
Další měření bylo prováděno se dvěma různě koncentrovanými roztoky chloristanu sodného. Příprava vzorku proběhla stejně jako v předešlém měření (tedy 3 μl zásobní DNA bylo smícháno s 2 997 μl chloristanu sodného). Poté bylo do kyvety přidáno 200 μl minerálního oleje. Kyvety jsme překryli parafilmem a vložili do spektrofotometru. Hodnota absorbance byla zaznamenána při zvýšení teploty vzorku v kyvetě o 3 $^{\circ}\text{C}$. Měření probíhalo v rozsahu od 30 $^{\circ}\text{C}$ do 90 $^{\circ}\text{C}$ při vlnové délce 260 nm. Pro obě koncentrace chloristanu sodného byla provedena tři nezávislá měření.

Obrázek 5.4 ukazuje naměřené výsledky. Grafy v panelu A zobrazují jednotlivé měření závislosti absorbance vzorku (vyšší křivka) a absorbance blanku (nižší křivka) na změně teploty. Měření bylo provedeno v prostředí chloristanu sodného o koncentraci 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V druhé řadě (panel B) jsou umístěny grafy, které znázorňují závislost absorbance vzorku na změně teploty po odečtení blanku. Jednotlivé body jsou proloženy pomocí programu GraphPad funkcí označovanou jako Boltzmanova sigmoida. Funkce je popsána rovnicí

$$y = \frac{A-B}{1+e^{-\frac{(x-C)}{D}}} + B . \quad (7)$$

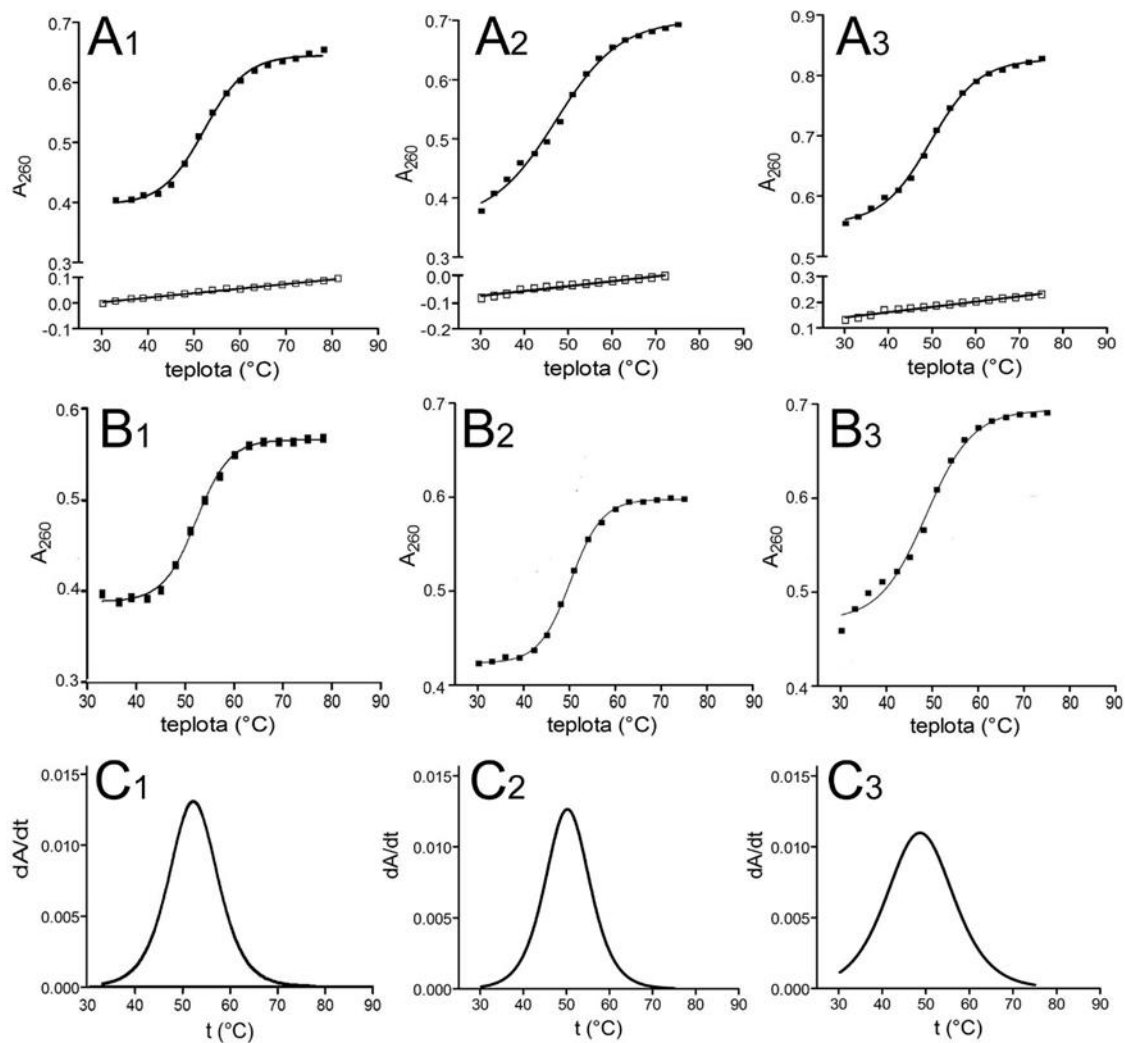
Obor hodnot této funkce leží v intervalu (A, B), parametr C vyjadřuje posunutí inflexního bodu sigmoidní funkce a parametr D je úměrný náklonu tečny v inflexním bodu.

Teplota tání odpovídá x-ové souřadnici inflexního bodu křivky tání. Provedli jsme proto derivaci výsledné funkce pomocí programu GraphPad. Derivace sigmoidních funkcí, kterými byly proloženy body z grafů v druhé řadě, lze vidět ve třetí řadě obrázku 5.4 v panelu C. Na základě této derivace, respektive její nejvyšší hodnoty, můžeme jednoznačně určit bod nejstrmějšího růstu absorbance neboli bod, který označujeme jako teplota tání.



Obrázek 5.4: Panely A: Závislost absorbance (A_{260}) na teplotě roztoku teplecí thymové DNA (■) a blanku - NaClO_4 (□). Panel B: Závislost absorbance vzorku DNA na teplotě po odečtení blanku. Panel C: Derivace funkcí, kterými byly proloženy body jednotlivých grafů v řadě B. Měření probíhalo v $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, indexy 1, 2 a 3 u značení jednotlivých panelů označují pořadové číslo měření

Další měření probíhalo s chloristanem sodným o koncentraci $1,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 5.5. První tři grafy (panel A) popisují, tak jako v předchozím případě, závislost absorbance vzorku DNA a absorbance blanku na teplotě. V panelu B jsou umístěny grafy znázorňující závislost absorbance vzorku DNA na teplotě po odečtení blanku. Body jsou opět proloženy sigmoidní funkcí, jejíž derivace je znázorněna v panelu C.



Obrázek 5.5: Panel A: Závislost absorbance (A_{260}) na teplotě roztoku telecí thymové DNA (■) a blanku - NaClO_4 (□). Panel B: Závislost absorbance vzorku DNA na teplotě po odečtení blanku. Panel C: Derivace funkcí, kterými byly proloženy body jednotlivých grafů v řadě B. Měření probíhalo v $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, indexy 1, 2 a 3 u značení jednotlivých panelů označují pořadové číslo měření

Z těchto měření jsme určili teploty tání T_m .

Tabulka 5.2: Hodnoty teploty tání T_m naměřené při jednotlivých měřeních s oběma koncentracemi chloristanu sodného

číslo měření	T_m (°C)	
	NaClO_4 ($c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	NaClO_4 ($c = 0,0015 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
1	62,0	52,3
2	62,8	50,2
3	63,1	49,6

Průměrná hodnota teploty tání vzorku DNA v chloristanu sodném o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a její směrodatná odchylka je:

$$T_m = 62,6 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$$

Průměrná hodnota teploty tání vzorku DNA v chloristanu sodném o koncentraci $1,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a její směrodatná odchylka je:

$$T_m = 50,7 \pm 1,2 \text{ }^\circ\text{C}$$

5.4 Měření teploty tání DNA pomocí spektrofotometru Cary 4000

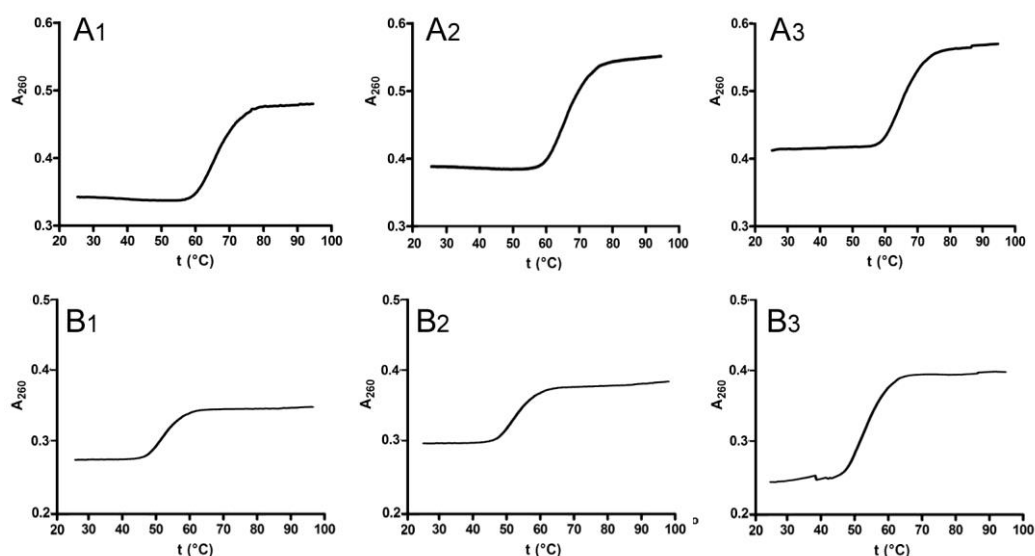
Pro ověření správnosti hodnot T_m získaných námi sestavenou aparaturou jsme změřili teploty tání identických vzorků DNA s využitím komerčního zařízení využívaného k tomuto účelu v Biofyzikálním ústavu AV ČR v Brně.

5.4.1 Příprava

Před měřením byl odebrán $1 \text{ }\mu\text{l}$ zásobního roztoku DNA do každé z šesti připravených zkumavek a poté byl naředěn na požadovanou koncentraci ($6,25\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Tři vzorky byly naředěny chloristanem sodným o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a další tři byly naředěny chloristanem sodným o koncentraci $1,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. K měření byly použity křemenné kyvety určené pro měření T_m dodávané s přístrojem. Před vložením kyvet do kovového bloku spektrofotometru byly ze vzorků v kyvetách odstraněny bublinky plynu pomocí vakuové vývěvy.

5.4.2 Měření závislosti absorpance na změně teploty

K měření byl využit UV-Vis spektrofotometr Cary 4000 (Varian). Automatické měření je řízeno pomocí softwaru CarryWin UV 3.00 (Varian). Byla provedena tři nezávislá měření pro obě použité koncentrace NaClO_4 . Obrázek 5.6 znázorňuje naměřené křivky.



Obrázek 5.6: Závislost absorbance (A_{260}) na teplotě roztoku telecí thymové DNA. Hodnota absorbance blanku je již odečtena (probíhá automaticky při měření). Panel A: Měření probíhalo v NaClO_4 o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Panel B: Měření probíhalo v NaClO_4 o koncentraci $0,0015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Indexy 1, 2 a 3 u značení jednotlivých panelů označují pořadové číslo měření

Měření byla vyhodnocena pomocí softwaru Thermal (Carry WinUV, 3.00), který je součástí přístroje. Naměřené hodnoty T_m jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 5.3: Hodnoty teploty tání T_m naměřené při jednotlivých měřeních s oběma koncentracemi chloristanu sodného

číslo měření	T_m (°C)	
	NaClO_4 ($c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	NaClO_4 ($c = 0,0015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
1	66,8	52,1
2	66,7	51,6
3	65,9	52,4

Průměrná hodnota teploty tání vzorku DNA v chloristanu sodném o koncentraci $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a její směrodatná odchylka je:

$$T_m = 66,5 \pm 0,4 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Průměrná hodnota teploty tání vzorku DNA v chloristanu sodném o koncentraci $1,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a její směrodatná odchylka je:

$$T_m = 52,0 \pm 0,3 \text{ } ^\circ\text{C}$$

5.5 Porovnání výsledků

Ze srovnání hodnot získaných na námi sestavené aparatuře a na komerčním přístroji je patrné, že tyto hodnoty se liší. Teploty tání naměřené na komerčním zařízení jsou vyšší než hodnoty získané měřením na aparatuře sestavené v rámci této bakalářské práce, přičemž rozdíl je větší v případě vyšších hodnot teploty tání. V případě, že byla teplota tání DNA měřena v prostředí o větší koncentraci NaClO_4 ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), činil tento rozdíl $3,9 \text{ }^\circ\text{C}$. V případě měření při nižší koncentraci NaClO_4 ($0,0015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) je rozdíl mezi oběma experimenty $1,3 \text{ }^\circ\text{C}$.

Příčiny tohoto rozdílu není jednoduché určit a jejich jednoznačné stanovení by překročilo časový rozsah určený pro bakalářské práce. Nicméně jednou z příčin rozdílů v naměřených hodnotách mezi komerční a námi sestavenou aparaturou by mohl spočívat v rozdílném přístupu k měření teploty vzorku. V námi sestavené aparatuře je teplota vzorku měřena přímo v kyvetě pomocí ponorné sondy, jedná se tedy skutečně o teplotu roztoku DNA v okamžiku měření, v komerčním přístroji je zaznamenávána teplota vyhřívaného kovového bloku, v kterém jsou kyvety umístěny. Přestože se teplota mění relativně pomalu ($0,2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$), nemusí tato doba stačit k vytemperování vzorku v kyvetě na stejnou teplotu. Reálná teplota roztoku v kyvetě tedy může být nižší než teplota termobloku, a proto je hodnota teploty tání naměřená na komerčním přístroji nadsazená oproti skutečnosti. Pokud by tomu tak bylo, tento rozdíl by se zvyšoval s rostoucí teplotou, což je v souladu s námi získanými výsledky. Data uvedená na obrázku 5.2 ukazují, že i v případě námi sestavené aparatury se teplota lázně a vzorku v kyvetě liší, a to tím více, čím vyšší je teplota. Z tohoto důvodu jsme proto zvolili měření teploty přímo v kyvetě. Na základě této úvahy lze tedy předpokládat, že hodnoty naměřené na námi sestavené aparatuře by mohly být správnější než hodnoty získané s využitím komerčního přístroje. Potvrzení tohoto předpokladu by však vyžadovalo provést další měření na BFÚ AV ČR v Brně, což už nebylo možné z časových důvodů uskutečnit.

6 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla sestavena aparatura, vhodná pro měření teplot tání vzorků DNA. Nejprve byly nalezeny podmínky vhodné pro měření a byly provedeny úpravy aparatury tak, aby bylo možno dosáhnout potřebných teplot měřených vzorků a zároveň eliminovat nepříznivé vlivy způsobené odpařováním a tvorbou vzduchových bublin.

Poté bylo takto sestavené zařízení využito k stanovení teploty tání DNA z telecího thymu ve dvou různých koncentracích chloristanu sodného. Výsledky byly srovnány s daty získanými měřeními identických vzorků na komerčním spektrofotometru Cary 4000, který je k měření teplot tání určen již od výrobce. Bylo zjištěno, že hodnoty získané na námi sestavené aparatuře jsou přibližně stejně přesné jako hodnoty z komerčně dostupného zařízení a lze předpokládat, že by mohly být i správnější vzhledem k rozdílnému způsobu měření teploty.

Závěrem lze tedy konstatovat, že aparatura sestavená v rámci této bakalářské práce je plně funkční a lze ji použít na měření teploty tání vzorků DNA.

Seznam literatury

Breslauer K. J., Frank R., Blöcker H., Marky L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(11), str. 3746-3750.

Bursová V. (2007) Termodynamická analýza DNA po její modifikaci protinádorově účinnými látkami. *Disertační práce*, MU v Brně.

Doktycz M. J. (1997) *Nucleic Acids: Thermal Stability and Denaturation* [online]. *Encyclopedia of Life Science*, Oak Ridge National Laboratory, USA, [cit. 2. 5. 2016] dostupné z: http://web.ornl.gov/~webworks/cpr/misc/107675_.pdf

Hrazdilová I. (2011) Měření konformačních vlastností nukleových kyselin. *Bakalářská práce*, VUT v Brně.

Kalous V., Pavlíček Z. (1980) *Biofyzikální chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, str. 83-90.

Kästner A. (2011) Determination of DNA and RNA Melting Point on UV-VIS Photometer SPECORD® PLUS, Publication UV VIS, Analytik Jena AG.

Kočárek E. (2008) *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia, str. 18-19 a 120 – 127. ISBN 978-80-86960-36-4.

Kohoutková V. (2006) Termodynamická analýza DNA po její modifikaci protinádorově účinnými látkami. *Bakalářská práce*, MU v Brně.

Ohyama T. (2005) *DNA conformation and transcription*, Molecular biology intelligence unit. New York: Springer Science Business Media, str. 3-12. ISBN 0-387-25579-6.

Sinden R. R. (1994) *DNA structure and function*. 1. vyd. San Diego: Academic Press, str. 34-38. ISBN 0126457506.

Snustad D. P. a Simmons M. J. (2009) *Genetika*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, str. 222-237. ISBN 978-80-210-4852-2.