



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

BIOCHEMICKÁ ANALÝZA DNA INTERAKČNÍCH PARTNERŮ

BIOCHEMICAL ANALYSES OF THE DNA INTERACTION PARTNERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Valchová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1158/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Michaela Valchová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Biochemická analýza DNA interakčních partnerů

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše, izolace DNA a studium interakčních partnerů DNA pomocí biochemických metod.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michaela Valchová
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce byla zaměřena na analýzu DNA. Nejprve byly hybridizovány fluorescenčně značené oligonukleotidy, které byly následně podrobeny HRM analýze, kdy byly zjišťovány teploty tání oligonukleotidů v závislosti na daném prostředí. Práce popisuje změnu teploty tání oligonukleotidů v prostředí jednomocných a dvojmocných iontů a vliv vazby proteinů na stabilitu těchto struktur DNA. Z teplot tání bylo stanoveno, zda daný iont/protein stabilizuje nebo destabilizuje daný oligonukleotid.

Dále byly izolovány vybrané plasmidy. Pomocí AFM byla sledována struktura izolovaných plasmidů.

KLÍČOVÁ SLOVA

DNA, HRM analýza, oligonukleotidy, AFM, plasmidy, křížové struktury

ABSTRACT

This thesis was focused on DNA analysis. The fluorescently labelled oligonucleotides were at first hybridised and subsequently analysed by HRM analysis to determine the melting temperatures of the oligonucleotides depending on the environment. This thesis describes the change of melting temperature of oligonucleotides in environments containing mono and bivalent ions and the influence of protein binding on the stability of these DNA structures. From determined melting points, it was specified whether the ion/protein stabilised or destabilised the oligonucleotide.

Furthermore, plasmids were isolated and analyzed by atomic force microscopy.

KEYWORDS

DNA, HRM analysis, AFM, oligonucleotides, plasmids, cross structures

VALCHOVA, M. *Biochemická analýza DNA interakčních partneru*. Brno. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 56 s. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych hlavně chtěla poděkovat svému vedoucímu doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Barboře Tomanové za čas, trpělivost a rady které mi oba věnovali, dále pak děkuji za předané zkušenosti a vědomosti. Dále bych pak chtěla poděkovat rodině a svým přátelům za psychickou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Deoxyribonukleová kyselina.....	9
2.1.1	Struktura DNA.....	9
2.1.1.1	Primární struktura	9
2.1.1.2	Sekundární struktura	10
2.1.1.3	Terciární struktura.....	11
2.1.1.4	Kvartérní struktura	11
2.1.2	Plasmidová DNA	11
2.1.3	Chemicky syntetizované oligonukleotidy.....	12
2.1.4	Možnosti interakce molekul s DNA	13
2.1.4.1	Nespecifická vnější vazba podél molekuly DNA	13
2.1.4.2	Interkalace	13
2.1.4.3	Vazba do žlábků.....	14
2.2	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM analýza)	15
2.2.1	Princip a průběh HRM.....	15
2.2.1.1	Využití HRM při analýze heteroduplexů	15
2.2.2	Saturační barviva	16
2.2.3	Fluorescenční sondy	18
2.2.3.1	Fluorofor	18
2.2.3.2	Fluorescenční rezonační přenos energie (FRET).....	18
2.2.3.3	Sondy FRET.....	19
2.2.3.4	TaqMan sondy.....	19
2.2.3.5	Molekulární majáky	20
2.2.3.6	Universal ProbeLibrary Systém (systém UPL).....	20
2.3	Mikroskopie atomárních sil.....	21
2.3.1	Síly působící v AFM.....	22
2.3.1.1	Van der Waalsovy síly	23
2.3.1.2	Kapilární síly	23
2.3.1.3	Síly krátkého dosahu	23
2.3.2	Možnosti měření	23
2.3.2.1	Kontaktní režim.....	23
2.3.2.2	Nekontaktní režim.....	24
2.3.2.3	Poklepový režim	24

3	CÍLE PRÁCE	25
4	EXPERIMENTALNÍ ČÁST	26
4.1	Materiál	26
	4.1.1 Chemikálie	26
	4.1.2 Roztoky	26
	4.1.3 Použité přístroje	27
	4.1.4 Syntetické oligonukleotidy	27
	4.1.5 Proteiny	28
	4.1.6 Plasmidy	28
4.2	Metody	28
	4.2.1 Hybridizace oligonukleotidů	28
	4.2.2 Separace oligonukleotidů pomocí polyakrylamidové gelové elektrofozý (PAGE)	28
	4.2.3 Vysokorozlišovací analýza křivek tání	29
	4.2.4 Příprava kompetentních buněk	31
	4.2.5 Transformace do kompetentních buněk (STBL4)	31
	4.2.6 Kultivace bakteriálních buněk <i>E coli</i> . STBL4	31
	4.2.7 Izolace plasmidové DNA	31
	4.2.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plasmidové DNA	32
	4.2.9 Agarósová gelová elektroforéza plasmidové DNA	32
	4.2.10 Příprava vzorků pro AFM	32
	4.2.11 Příprava AFM mikroskopu před měřením	33
	4.2.12 Sledování struktury izolovaných plasmidů pomocí AFM	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
5.1	Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)	35
5.2	HRM analýza oligonukleotidů s vybranými ionty	35
	5.2.1 HRM analýza oligonukleotidu p53con s vybranými ionty	36
	5.2.2 HRM analýza oligonukleotidu linBRCA s vybranými ionty	38
	5.2.3 HRM analýza oligonukleotidu hTel s vybranými ionty	40
5.3	HRM analýza oligonukleotidu p53con s proteiny	41
	5.3.1 Statistické zpracování výsledků HRM analýzy s proteiny	42
5.4	Izolace plasmidové DNA	43
5.5	Agarósová gelová elektroforéza plasmidové DNA	43
5.6	Stanovení koncentrace a čistoty plasmidové DNA spektrofotometricky	43

5.7	Sledování struktury plasmidů pomocí AFM	44
6	ZÁVĚR.....	48
	CITACE	49
	SEZNAM ZKRATEK.....	56

1 ÚVOD

Nukleové kyseliny jsou makromolekuly, které jsou tvořeny polynukleotidovým řetězcem. Nukleové kyseliny jsou odpovědné za přenos a uchování genetické informace. Nejznámější jsou kyselina deoxyribonukleová (DNA) a kyselina ribonukleová (RNA). Struktury DNA mají významný vliv v oblasti lékařství, kde se využívají při výzkumu a vývoji léčiv a vakcín. Tato léčiva mají vysoký potenciál při léčbě řady nemocí. Plasmidové struktury DNA se využívají jako vektory při klonování, díky čemuž je možno přenést genetický materiál do organismů.

Jednou z významných metod, která slouží k vizualizaci DNA, patří mikroskopie atomárních sil. Tato metoda se využívá pro zobrazení a porozumění struktury DNA, ale také ke zjištění poškození dané DNA.

Interakce nukleových kyselin s některými látkami způsobuje strukturální změny v místě vazby. Výzkum v oblasti interakcí DNA by mohl být významný z hlediska léčiv. Interakce DNA je možno sledovat pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání, kdy je možno z křivek určit, zda daná látka DNA destabilizuje nebo naopak stabilizuje.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Deoxyribonukleová kyselina

Deoxyribonukleová kyselina, běžně označována zkratkou DNA, je nositelkou genetické informace všech organismů, s výjimkou nebuněčných organismů, u kterých je nositelem dědičné informace RNA [1].

DNA byla poprvé izolovaná v roce 1869 švýcarským lékařem Fridrichem Miescherem [2][3]. Ale až ve 40. letech bylo prokázáno, že je DNA nositelkou genetické informace a to díky pokusům Averyho, MacLeoda a McCartyho. Ti prokázali, že dědičná informace je uložena v DNA a vyvrátili tak dřívější názory o tom, že je uložena v proteinech [4]. V roce 1953 byla rozluštěna trojrozměrná struktura DNA. James D. Watson a Francis Crick předvedli model dvoušroubovice. Došli k závěru, že nukleotidy jsou mezi sebou propojeny a tvoří antiparalelní dvoušroubovicový řetězec. Za tento objev obdrželi v roce 1969 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu [5].

Abychom pochopili kódování genetické informace a uložení této informace ve dvoušroubovici DNA, musíme se zaměřit na uspořádání a samotnou strukturu DNA [6]. Struktura DNA obsahuje chemickou informaci, která je zodpovědná za přenos genetické informace do dceřiných buněk, aniž by došlo ke změně z generace na generaci [7].

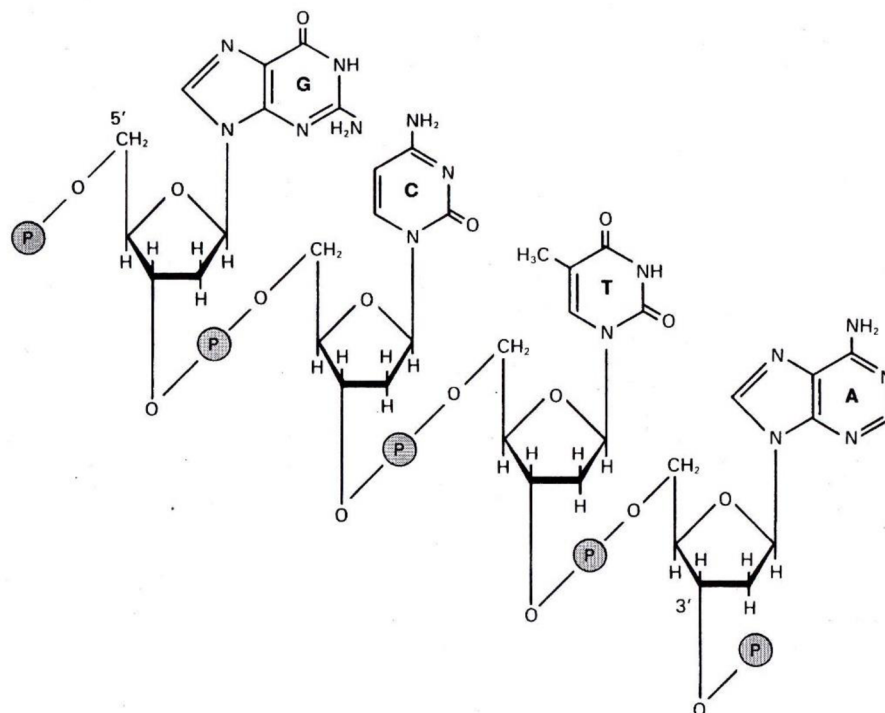
2.1.1 Struktura DNA

DNA je polymerní makromolekula, která je složena z monomerních jednotek nukleotidů. Molekula DNA, kterou tvoří méně než 200 nukleotidů, se nazývá oligonukleotid. Nukleotidy jsou tvořeny třemi částmi: 2-deoxy-D-ribosou, dusíkatou bází a fosfátovou skupinou [3].

2.1.1.1 Primární struktura

Řetězce polynukleotidu (Obrázek 1) vznikají polymerací nukleotidů, ty jsou tvořeny pětiuhlíkatým cukrem 2-deoxy-D-ribosou, dusíkatou heterocyklickou bází (adenin, cytosin, guanin, thymin) a zbytkem kyseliny fosforečné. Spojení jednotlivých nukleotidů vzniká chemickými interakcemi mezi fosfátem jednoho nukleotidu a cukernou složkou druhého nukleotidu, tzn. fosfodiesterovou vazbou ve směru od 5' ke 3' konci [3][8]. Dusíkaté báze jsou připojeny k deoxyribose pomocí N-glykosidové vazby. Adenin a guanin patří mezi purinové deriváty a thymin, cytosin patří mezi pyrimidinové deriváty [3]. Dusíkaté báze protějších polynukleotidů jsou spojeny vodíkovými vazbami na základě komplementarity [5]. Dochází k vazbě jen specifických bází, adenin a thymin spojují dva vodíkové můstky a cytosin a guanin spojují tři vodíkové můstky [3].

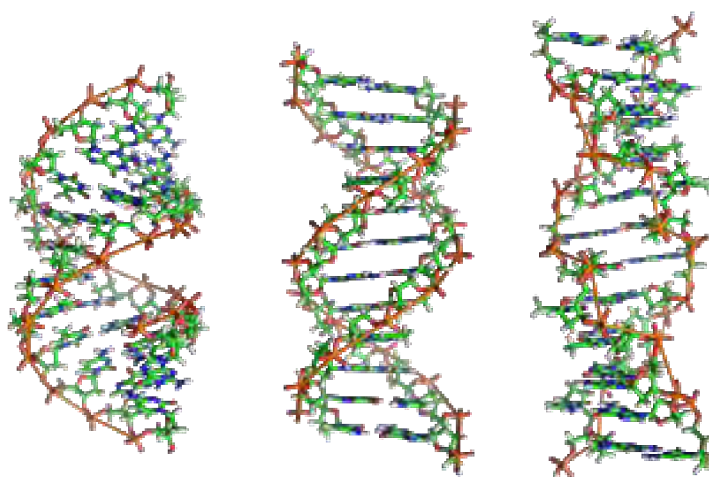
Primární struktura slouží k určení pořadí jednotlivých nukleotidů. Jelikož jednotlivé nukleotidy nejsou seřazeny v řetězci náhodně, můžeme rozlišit jednotlivé sekvence [5][9]. V primární struktuře DNA je zakódována genetická informace [10].



Obrázek 1: Úsek řetězce DNA [4]

2.1.1.2 Sekundární struktura

DNA je tvořena dvoušroubovicí. Za určitých podmínek může vznikat i trojzávitové uspořádání (triplex) nebo i čtyřzávitové uspořádání (kvadruplex), i když za běžných fyziologických podmínek převládá dvoušroubovice. Dva polynukleotidy jsou stočeny podél osy řetězce. Vlákná polynukleotidu jsou orientována antiparalelně a dusíkaté báze mají uloženy uvnitř molekuly [3]. Znamená to tedy, že jedno vlákno je řazeno od 5'–3' konce a druhé opačně od 3'–5' konce [6]. Na jeden závit dvoušroubovice připadá zhruba 10 nukleotidových zbytků. Na šířku má molekula dvoušroubovice DNA 2 nm [11]. DNA může existovat v několika různých formách, například jako A-, B- a Z-DNA (Obrázek 2). Řetězce DNA se nejčastěji vyskytují ve formě pravotočivé dvoušroubovice, která je označována jako B-forma [12]. A-forma je méně obvyklá, a i méně stabilní forma než B-forma. Vyskytuje se převážně v roztocích s vysokou iontovou silou [9]. Pokud dojde k opakování purinů a pyrimidinů (GCGCGCGC), vzniká levotočivá dvoušroubovice, která se označuje jako Z-forma. Tato struktura DNA je poměrně vzácná. Vždy vznikají energeticky nejvýhodnější konformace. Při stabilizaci sekundární struktury DNA mají nejdůležitější úlohu vodíkové můstky a hydrofobní interakce [5].



Obrázek 2: A-, B-, a Z- konformace DNA [13]

2.1.1.3 Terciární struktura

Terciární struktura vzniká, pokud se do dvoušroubovice DNA vloží další vinutí. Terciární struktura se označuje jako nadšroubovice nebo superhelix. Superhelix tedy může vzniknout záporným, nebo kladným vinutím dvoušroubovice [14].

2.1.1.4 Kvartérní struktura

Kvartérní struktura DNA vzniká, pokud dojde k interakci mezi molekulami DNA, popřípadě mezi molekulou DNA s proteinem [15]. Kvartérní struktura vznikne vazbou DNA na histony, kdy vzniká nukleozom, který se dále skládá do chromatinových vláken [16]. Dále sem patří komplexy proteinu s DNA jako je chromatin nebo ribozomy [17].

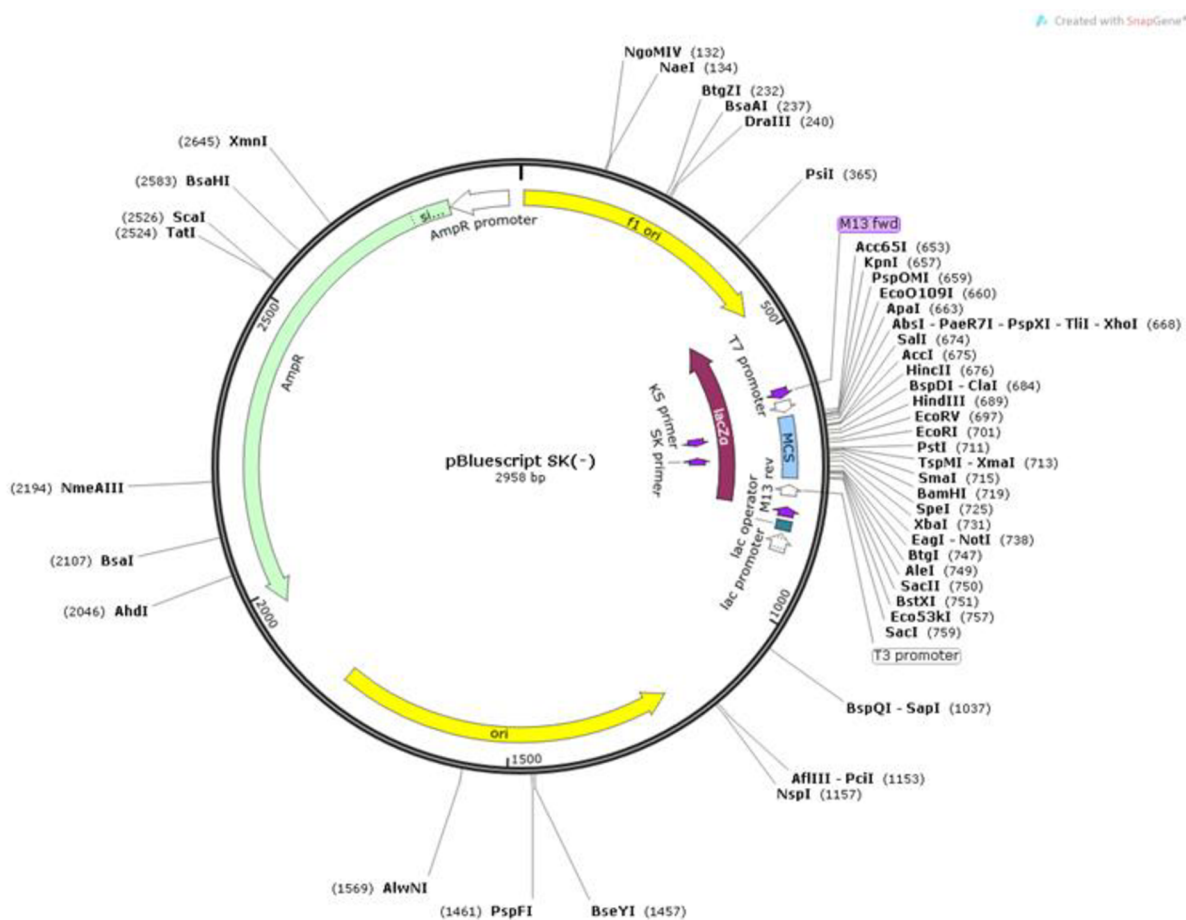
2.1.2 Plasmidová DNA

Plasmidy jsou úseky DNA, které se obvykle vyskytují v cytoplasmě u bakterií, archebakterií a méně u eukaryot [18]. Plasmidy často obsahují geny, které nejsou pro bakteriální buňky esenciální. Plasmidová DNA se může vyskytovat v několika možných formách – nadšroubovicová, kovalentní uzavřená kružnice (ccc), otevřená kružnicová forma a lineární. Nejběžnější formou plasmidové DNA je kružnicová molekula. Kružnicová molekula plasmidové DNA je vhodná pro přenos genetické informace a může se vyskytovat v buňce v několika kopiích, na rozdíl od chromozomální DNA, která se zpravidla v buňce vyskytuje pouze v jedné kopii. Jeden plasmid má velikost 1000–200 000 párů bází. Plasmidy tvoří zhruba 1–5 % prokaryontní DNA [14][19].

Plasmidy používané ke klonování jsou proti přirozeným plasmidům upravené. Aby byl výtěžek plasmidové DNA dostatečně vysoký, je důležité zajistit stabilitu a vysoký počet kopií. Komerčně dostupné plasmidy obsahují několik důležitých sekvencí. Počátek replikace, který je zodpovědný za efektivní produkci nových kopií [20]. Druhou sekvencí je selekční marker, důležitý pro selekci transformovaných bakterií. Jelikož plasmid bývá vnesen pouze do malé části buněčné populace, používá se gen pro podporu růstu, který má fenotypově dominantní rezistenci k antibiotiku. Nejpoužívanější jsou geny s rezistencí k ampicilinu, tetracyklinu a chloramfenikolu. Další částí je polyklonovací místo s velkým množstvím míst pro restriční endonukleázy pro vkládání cizorodé DNA [21].

Plasmid pBluescript (Obrázek 3) je fagemidový vektor, který byl navržen tak, aby bylo

možné rychlé mapování DNA inzertů. Tento plasmid obsahuje cílová místa pro 21 restrikčních enzymů v libovolné orientaci. Uspořádání restrikčních míst umožňuje jednosměrné delece pomocí nukleázy [22].



Obrázek 3: Mapa plasmidu pBluescript [23]

2.1.3 Chemicky syntetizované oligonukleotidy

Syntetické oligonukleotidy se používají jako sondy při Southernově přenosu na DNA z organismu, který produkuje daný protein. Tohoto se využívá, pokud chceme získat gen kódující daný protein. Díky znalosti genetického kódu lze syntetizovat oligonukleotid, který je komplementární k danému genu. Sonda specificky označí gen pro daný protein, a tak umožní jeho izolaci. Další možností využití syntetických oligonukleotidů jsou specifické změny genů místně cílenou mutagenézí. Oligonukleotid obsahuje úsek se změněnou sekvencí a použije se jako primer pro replikaci daného genu. Při hybridizaci oligonukleotidu lze použít takovou teplotu, aby vznikly dokonale komplementární oligonukleotidy.

Syntéza oligonukleotidů je podobná syntéze polypeptidů. Kdy je vhodně chráněný oligonukleotid připojen k rostoucímu konci řetězce, dojde k odstranění chránicí skupiny a děj se opakuje, dokud nevznikne cílený oligonukleotid [12].

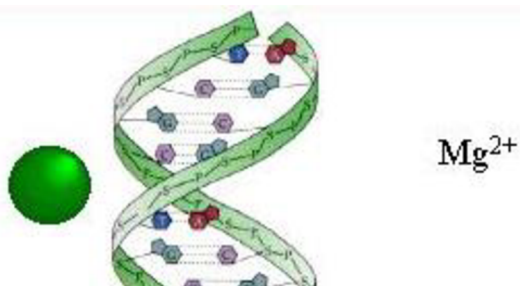
2.1.4 Možnosti interakce molekul s DNA

DNA může interagovat specificky nebo nespecificky s mnoha látkami u kovalentních vazeb vnikají adukty, které nemohou disociovat za fyziologických podmínek [24]. Nekovalentní interakce mají výrazně nižší energii. K interakci dochází prostřednictvím malého a velkého žlábků DNA, popřípadě mohou planární sloučeniny vstoupit do mezi bázevého prostoru. Takovéto vmezeření se označuje jako interkalace. Rozsah interakce ovlivňují vlastnosti prostředí, charakter ligandů i sekvence nukleové kyseliny [26].

2.1.4.1 Nespecifická vnější vazba podél molekuly DNA

Nespecifická vnější vazba (Obrázek 4) je elektrostatického původu. Do této skupiny patří vazby iontů a polyaminů. Ionty nejsou vázány na specifickém místě a mohou migrovat. Vazby dvojmocných iontů na DNA ovlivňují stabilitu terciárních a kvartérních struktur. K dalším efektům nespecifické vnější vazby patří změna teploty tání dvoušroubovice DNA pomocí dvojmocných iontů. Pokud je v roztoku DNA přítomný kationt, přispívá k odstínění negativního náboje fosfátových skupin. Aby mohla hybridizace dvou komplementárních vláken DNA proběhnout úspěšně, je důležité najít ideální podmínky. Podmínky, které ovlivňují hybridizaci jsou: teplota hybridizace, délka hybridizovaného řetězce, stupeň komplementarity, koncentrace soli a pH reakční směsi [24].

Jednomocné alkalické kovy jsou velice reaktivní. Alkalické kovy se vážou na strukturu iontovou vazbou. Tyto jednomocné ionty (Na^+ , K^+ , Rb^+ a další) preferují přímou vazbu na DNA [24]. Dvojmocné kovy alkalických zemin jsou ještě reaktivnější než kovy alkalické. Mg^{2+} je hlavní intracelulární dvojmocný iont a účastní se všech aktivačních procesů ve struktuře DNA [25]. Dvojmocné kationty jako je Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} nebo Ba^{2+} ovlivňují konformaci DNA [24].



Obrázek 4: Nespecifická vnější vazba podél molekuly DNA [27]

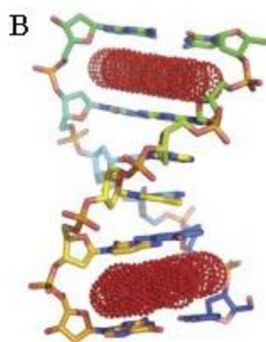
2.1.4.2 Interkalace

Při vmezeření (Obrázek 5) ligandu s vhodným planárním uspořádáním mezi páry bází dochází ke stabilizaci nekovalentními vazbami [28].

Pokud se mezi báze vmezeří planární aromatická sloučenina, dojde ke stabilizaci a zpevnění konformace, nárůstu délky DNA a zároveň může dojít k částečnému rozvinutí nukleové kyseliny. Díky tomu může dojít ke změně účinnosti enzymů, které působí na DNA [26]. Účinnou interkalaci podporuje hydrofobicita rozpouštědla a iontová síla prostředí [29]. Interkalátory dělíme do tří skupin – klasické, neklasické a bisinterkalátory.

Klasické interkalátory jsou dobře prostudovanou skupinou. Mají dokonale planární molekulu, díky velkému sklonu k interkalaci s DNA způsobují často genotoxický účinek [26]. Do této skupiny se řadí aridiny, etidium bromid a přírodní ellipticin [30]. Neklasické

interkalátory jsou pouze částečně planární a nejsou zcela aromatické [26]. Bisinterkalátory jsou složeny z dvou interkalujících heterocyklických sloučenin, které jsou propojeny alkylovým řetězcem. Příkladem může být močovina, která vytvoří více vodíkových vazeb se strukturou DNA [31].

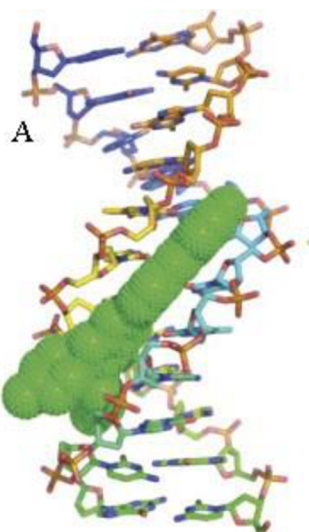


Obrázek 5: Vmezeření do mezibazálního prostoru [26]

2.1.4.3 Vazba do žlábků

Při navázání molekuly do velkého nebo malého žlábků DNA (Obrázek 6) nedochází k tak velkým konformačním změnám jakou interkalace. Zároveň nedochází ke změnám v délce dvoušroubovice. Tyto látky mohou ovlivnit teplotu tání DNA.

Malé molekuly se váží na malý žlábek. Vykazují i vyšší afinitu k A-T pářům a mají vyšší elektrostatický potenciál. Patří sem například nepropsin, dystamycin nebo barvivo DAPI (4',6-diamino-2-fenylindol). Velké molekuly upřednostňují velký žlábek. Sem se váží regulační proteiny [32]. Vazby do žlábků stabilizují mezimolekulové interakce. Jejich asociační konstanta je vyšší než u interkalátorů [26].



Obrázek 6: Vmezeření do žlábků DNA [26]

2.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM analýza)

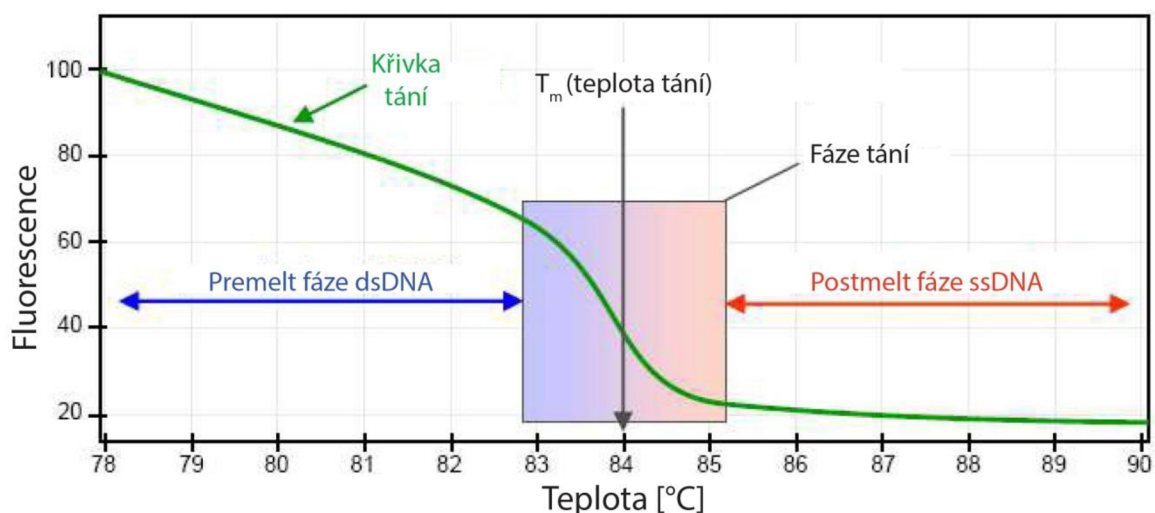
Vysokorozlišovací analýza křivek tání neboli High Resolution Melting (HRM), je moderní metoda, která byla zavedena v roce 2002 [34][33]. Tato metoda je velice citlivá, a proto umožňuje rozpoznávat i velice malé rozdíly ve tvarech křivek tání [34]. Díky tomu je HRM vhodná i pro detekci úseků, které se liší pouze o jednu bázi a drobné inserce [35]. Velmi často se používá při polymerázové řetězové reakci (PCR) v reálném čase, jako ověřovací metoda toho, zda byl nasyntetizován specifický PCR produkt [36]. Dále se tato metoda využívá ke genotypizaci, při analýze mutací nebo pro identifikaci druhů, další možností je využití při metylační analýze [33][37].

HRM představuje velice rychlou techniku, která je finančně nenáročná a technicky jednoduchá [38]. Přesto je tato metoda velice specifická a senzitivní. Pro určení teplot tání není potřeba separace, jak je tomu například u jiných sekvenovacích metod, to vede ke snížení časové náročnosti HRM analýzy. HRM metoda je nedestruktivní a šetrná ke vzorku analyzované DNA [39].

2.2.1 Princip a průběh HRM

Principem metody je sledování disociace dvoušroubovice DNA za postupného, vysoce přesného a stabilního zvyšování teploty (citlivost až 0,01 °C/s) a přeměna na jednořetězcovou DNA [40]. Dvoušroubovice DNA (dsDNA) je poměrně stabilní při pokojové teplotě. Při vzrůstající teplotě dochází k disociaci, kdy se od sebe jednotlivá vlákna separují. Teplota, při které dojde k rozdělení 50 % dsDNA na jednotlivé řetězce, se nazývá teplotou tání (T_m). Teplota tání je závislá jak na délce DNA fragmentu, tak na obsahu párů guanin a cytosin. Jelikož jsou tyto báze vázány třemi vodíkovými vazbami, jsou stabilnější než páry adenin a thymin, které mají pouze dvě vodíkové vazby. Sekvence DNA s větším obsahem párů guanin a cytosin mají vyšší teplotu tání než sekvence, které obsahují menší počet těchto vazebných párů [35]. Aby mohly být křivky tání vyhodnoceny, musí být analýza prováděna za přítomnosti fluorescenčního barviva. V průběhu měření je snímána a zaznamenávána intenzita fluorescenčního signálu ve vysokém rozlišení [41][40].

Na počátku je získaná fluorescence největší. To je způsobeno vysokým počtem dvouřetězcových molekul DNA s navázaným fluorescenčním barvivem. Při zvyšující se teplotě postupně dsDNA disociuje, dochází k uvolňování barviva a následnému snížení fluorescence [35][42]. Výsledkem je křivka tání (Obrázek 7), která popisuje závislost intenzity fluorescence na teplotě. Pro lepší čitelnost výsledků bývá křivka převedena na normalizovanou křivku tání. Křivka tání je složena ze tří částí. Nejprve se jedná o premelt fázi, v této fázi je DNA ve dvouřetězcové formě. Při premelt fázi je fluorescence největší. Poté následuje postupné zvyšování teploty, tato fáze se nazývá melt fáze. Dochází k denuraci dvouřetězcové molekuly, což způsobí pokles intenzity fluorescence. Z inflexního bodu křivky se určuje teplota tání. Poslední, třetí fázi je postmelt fáze. V tomto okamžiku je přítomna pouze jednořetězcová DNA a intenzita fluorescence je minimální [41]. Pro jednodušší odečet teploty tání se využívá diferenčních křivek. V takovémto případě se využívá závislosti derivované fluorescence na teplotě, kdy vznikají píky, které odpovídají teplotám tání amplikonu [41].



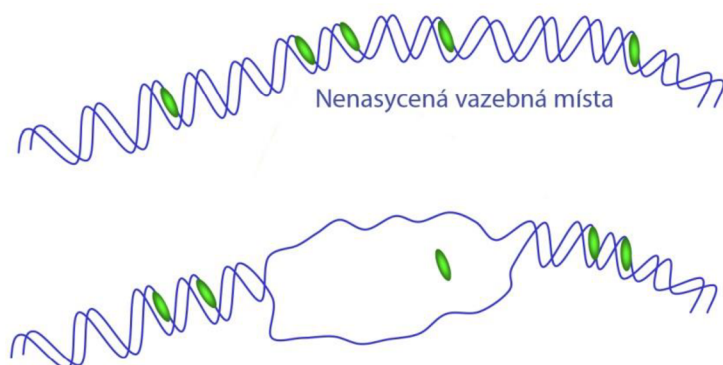
Obrázek 7: Křivka tání, upraveno dle [43]

2.2.1.1 Využití HRM při analýze heteroduplexů

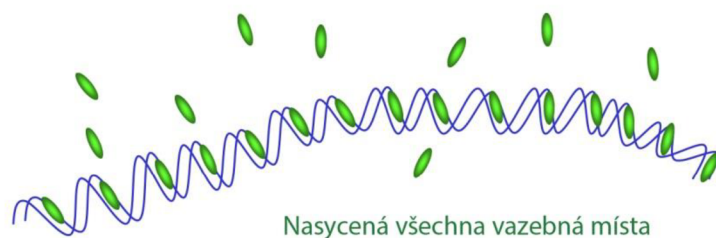
HRM je možné použít k analýze heteroduplexů. Heterozygotní vzorek, který obsahuje dvě alely stejného genu ale s rozdílem v jedné bázi, se po amplifikaci nechá zdenaturovat teplem a následně dojde k reasociaci jednotlivých řetězců. Vzniknou čtyři odlišné produkty, dva jsou homoduplexní s typickým párováním bází a dva heteroduplexní. Všechny čtyři mají rozdílné fyzikální vlastnosti, nejvýraznější vlastností je rozdílná teplota, při které dvouřetězce disociují. Po provedení HRM analýzy duplexy poskytují charakteristické křivky tání. Heteroduplexy mají nižší teplotu tání a zároveň mají i jiný tvar křivky tání. Pokud vzorek obsahuje homozygotní formu s mutací, dojde pouze k posunu teploty tání [41].

2.2.2 Saturační barviva

Pro HRM analýzu se nedají použít běžná fluorescenční barviva (Obrázek 8), která se používají pro PCR v reálném čase a analýzu křivek tání, protože jsou tato barviva pro polymerázu toxická a dochází k následné inhibici PCR. Navíc u běžných barviv dochází k redistribuci barviva během denaturace, což omezuje monitorování fluorescence ve vysokém rozlišení. Proto byla vyvinuta saturační barviva (Obrázek 9) pro HRM analýzu, která vykazují maximální fluorescenci. Saturační barviva mají mnohem nižší toxicitu než fluorescenční barviva. V řetězci DNA vyplní saturační barvivo všechna vazebná místa. Nejčastěji používaná plně saturační barviva jsou např. SYTO9 nebo SYBR Green I [35][40].



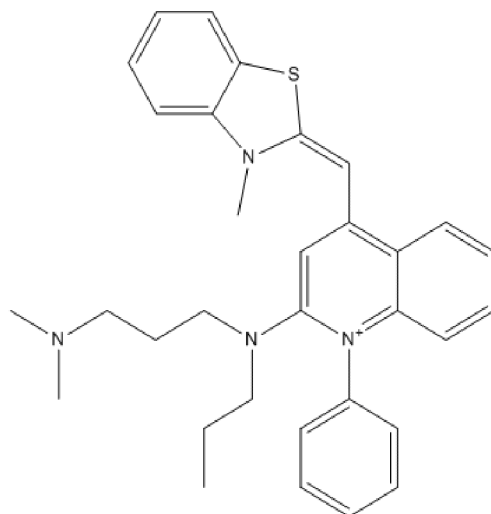
Obrázek 8: Plně nenasaturační barvivo. Upraveno dle [43]



Obrázek 9: Plně saturační barvivo. Upraveno dle [43]

SYTO9 nepůsobí inhibičně na DNA polymerázu ani při vysokých koncentracích. Toto barvivo umožňuje rovnoměrné označení celého produktu, což je důležité pro detekci všech amplifikovaných oblastí [40]. Po navázání na DNA se SYTO9 stává vysoce fluorescenční.

SYBR Green I (Obrázek 10) patří mezi kyaninová barviva. Využívá se pro barvení dsDNA, protože má vysokou afinitu právě pro dsDNA. To je způsobeno tím, že SYBR Green I obsahuje dva pozitivní náboje. Bylo zavedeno už na počátku devadesátých let. Toto barvivo se stalo nejčastěji používaným vzhledem k nízké pořizovací ceně [46].



Obrázek 10: Vzorec sloučeniny SYBR Green I [47]

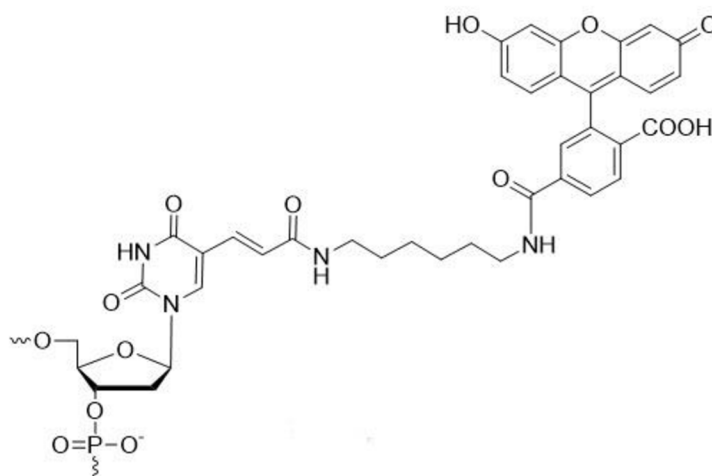
2.2.3 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou malé organické molekuly, které interagují s biologickými molekulami. Přitom dochází k indukci změn jejich fotochemických vlastností, jako je intenzita fluorescence nebo excitační nebo emisní vlnová délka [48]. Fluorescenční sondy se dělí podle principu funkce. Mezi hlavní skupiny patří sondy založené na přenosu fotoindukovaných elektronů (PeT), přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET), přenosu intramolekulárního náboje (IKT) a spirocyklizaci [49][50].

2.2.3.1 Fluorofor

Jako fluorofor se označuje molekula, která je schopná po osvětlení světlem o určité vlnové délce absorbovat energii záření a okamžitě ji přeměnit na emisní záření o delší vlnové délce [51]. Fluorofor může být malá organická sloučenina s aromatickým jádrem, nebo protein. K makromolekule bývá fluorofor připojen kovalentní vazbou, zde slouží jako značka při detekci. Jako fluorofor se používá například 6-karboxyfluorescein (FAM), tetrachlorfluorescein (TET) nebo tetramethylrhodamin (TAMRA) [51]. Nová generace fluoroforů je účinnější, stabilnější na světle a méně náchylná ke změnám pH [53].

6-karboxyfluorescein (Obrázek 11) je jedním z nejčastěji používaných fluoroforů pro značení oligonukleotidů. Používá se jako reportérový motiv v sondách TaqMan, Scorpionových primerech a molekulárních majácích [54][55]. 6-karboxyfluorescein se v sondách používá spolu se zhášedlem BHQ-1. 6-FAM a BHQ mají dobrý spektrální překryv potřebný pro vznik FRET [56].



Obrázek 11: Vzorec sloučeniny 6-karboxyfluorescein [57]

Tetramethylrhodamin se používá jako zhášedlo pro oligonukleotidy značené dvojitým barvivem. Barvivo je stabilní ve všech běžných rozpouštědlech, stabilita barviva klesá se zvyšující se koncentrací hydroxidu amonného, ten se běžně používá ke štěpení oligonukleotidů. Toto barvivo se používá jako součást TaqMan a FRET sond [58].

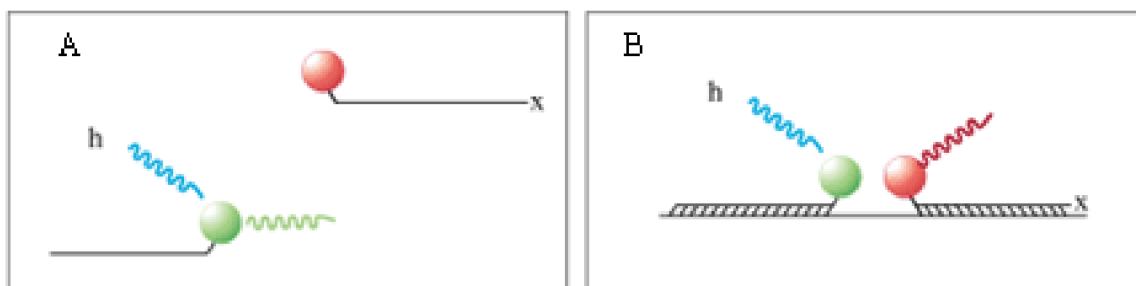
2.2.3.2 Fluorescenční rezonační přenos energie (FRET)

Na principu fluorescenčního rezonančního přenosu energie je založena většina sond. Tyto sondy mají dva druhy fluorescenčních značek–reportér a zhášeč. Zhášeč je odpovědný

za pohlcení excitované energie se specifickou vlnovou délkou v okolí reportéru. To způsobí, že reportér není schopen emitovat fluorescenci do okolí. Emise může opět proběhnout, pokud se reportér se zhášedčem dostatečně vzdálí [59]. Aby mohlo k přenosu FRET dojít, musí být fluorescenční značky ve vzdálenosti 1–10 nm [60]. Dále se musí překrývat emisní spektrum zhášedče a excitační spektrum reportéru a zároveň musí mít stejný dipólový moment [61].

2.2.3.3 Sondy FRET

FRET sondy jsou navrženy tak, aby docházelo k hybridizaci na sousedním segmentu nukleové sekvence. Jedna sonda je značena na 3' konci fluoresceinem, nebo jiným podobným fluoroforem, který má excitační maximum okolo 480 nm. Tato sonda se nazývá donor. Druhá sonda může být značena jedním z mnoha barviv, které má vyšší excitační a emisní maximum než donor [62]. Příkladem barviva mohou být kyaninová barva Cy3 a Cy5, TET (6-karboxy-4,7,20,70 tetrachlorofluorescein) nebo TAMRA (6-karboxy-N,N,N',N' tetramethylrhodamin). Takto značená sonda je akceptorem a musí být zablokována na svém 3' konci, aby nedocházelo k prodlužování sondy polymerázou během PCR reakce. Volně v roztoku fluorescein donoru emituje zelené záření s vlnovou délkou 480 nm. Pokud dojde k hybridizaci obou sond s DNA, donor předá energii akceptoru, ten emituje fluorescenční záření s dlouhou vlnovou délkou. Princip je znázorněn na Obrázku 12. Na rozdíl od hydrolizačních sond nejsou FRET sondy degradovány a jejich fluorescence je tedy reverzibilní. To umožňuje určení teplot tání T_m v analýze křivek tání [63].



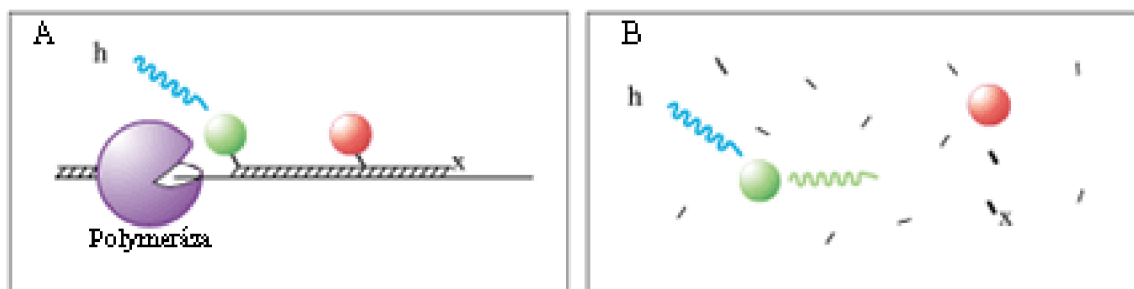
Obrázek 12: Princip FRET sond. A) Sonda donoru volně v roztoku emituje záření o nižší vlnové délce, B) Pokud dojde k hybridizaci obou sond s DNA, donor předá energii akceptoru, ten emituje fluorescenční záření s dlouhou vlnovou délkou [64]

2.2.3.4 TaqMan sondy

TaqMan sondy (Obrázek 13), nebo též hydrolyzační oligonukleotidové sondy, mají na 3' konci zhášedč a na 5' konci se nachází kovalentně navázaný reportér [65]. Jako reportér se nejčastěji využívá FAM [66]. Princip účinku spočívá ve využití 5'→3' exonukleázové aktivity *Taq* DNA polymerázy. Původně TaqMan sondy nevyužívaly principu FRET, ale byly založeny na značení radioaktivními látkami [67].

Dochází k redukci fluorescence zhášedče v důsledku působení reportéru, který je v bezprostřední blízkosti. Při amplifikaci polymeráza připojuje volné dNTP od primeru k sondě, kterou od 5' konce štěpí. Dochází ke vzdálení a tím se zruší působení zhášedče na reportér, ten emituje fluorescenci [68]. Výhodou je, že k fluorescenci dochází pouze

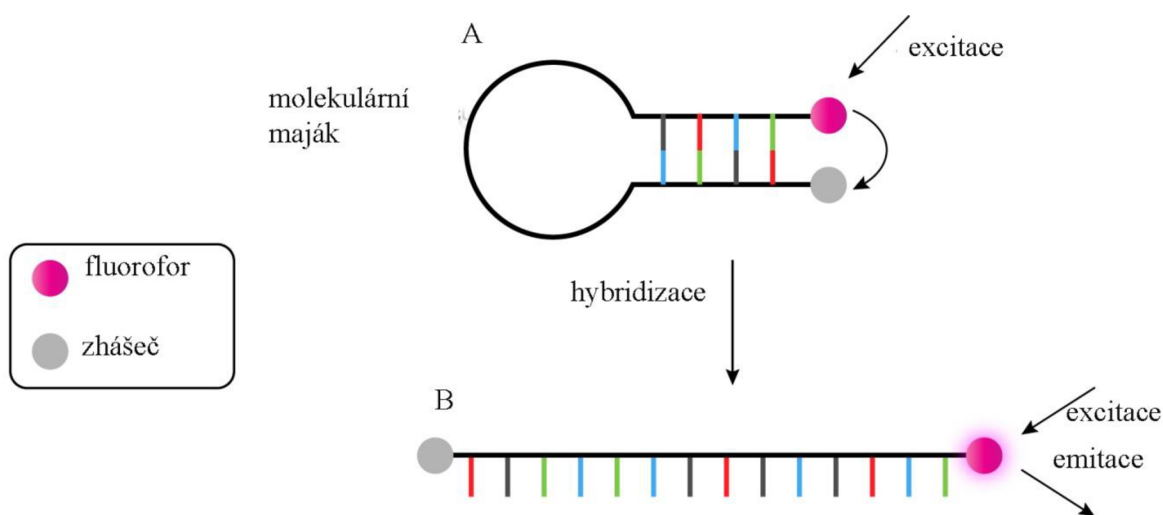
po hybridizaci na specifickém místě. Tyto sondy se používají při detekci amplifikace specifických produktů PCR v reálném čase [61].



Obrázek 13: Princip účinku sond TaqMan. A) Sonda se naváže na cílovou sekvenci DNA. B) Reportér není ovlivněn zhášečem a emituje fluorescenci. Upraveno dle [64]

2.2.3.5 Molekulární majáky

Molekulární majáky jsou oligonukleotidové sondy, které mají tvar smyčky se dvěma rameny [69]. Smyčka obsahuje sekvenci komplementární k cílové sekvenci a ramena jsou k sobě komplementární. Fluorofor je kovalentně napojen na jedno rameno a zhášeč je připojen ke druhému ramenu. Molekulární majáky nefluoreskují volně v roztoku. Jelikož je v blízkosti fluoroforu zhášeč, který absorbuje jeho emitovanou energii. Pouze pokud hybridizují s řetězcem nukleové kyseliny, dojde ke změně konformace, kdy se fluorofor oddálí od zhášeče a to umožní emitování fluorescence [70]. Princip účinku je znázorněn na Obrázku 14.



Obrázek 14: A) v blízkosti fluoroforu je zhášeč, který absorbuje jeho emitovanou energii a nedochází k fluorescenci. B) fluorofor se oddálí od zhášeče a dojde k emisi fluorescence Upraveno dle [71]

2.2.3.6 Universal ProbeLibrary Systém (systém UPL)

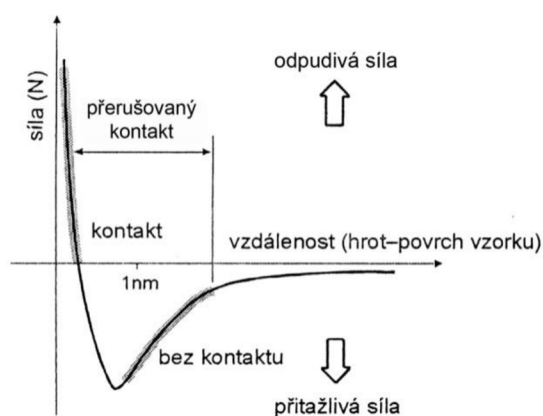
Tuto skupinu tvoří 165 krátkých sond, které se skládají z LNA (Locked Nucleic Acids) nukleotidů [72]. LNA je uzavřená nukleová kyselina, v tomto nukleotidu

se vytvoří vazba mezi 2'-O a 4'-C. Délka sond je okolo 8–9 nukleotidů oproti běžným 25–30 nukleotidům [73]. Díky svojí délce a obsahu LNA si zachovávají potřebné Tm. Na 5' konci jsou značeny fluoresceinem a na 3' konci mají zhášec. Díky svojí délce se tyto sondy mohou vázat až na 7000 transkriptů a každý transkript může být detekován 16 sondami [72].

2.3 Mikroskopie atomárních sil

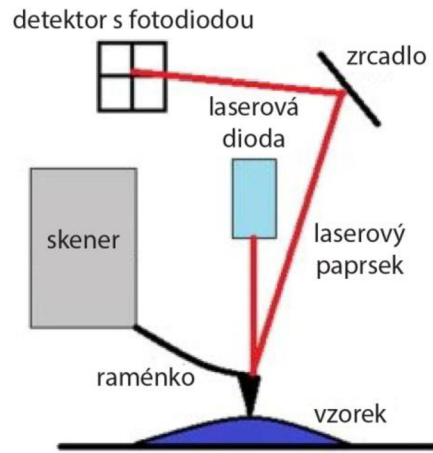
Mikroskopie atomárních sil (AFM – Atomic Force Microscopy) patří do skupiny mikroskopie skenující sondou (SPM – Scanning Probe Microscopy) [74]. Tato metoda byla poprvé použita v roce 1986 a představili ji G. K. Binnigen, C. F. Quate a Ch. Gerber [75].

Výhodou této metody je fakt, že lze zkoumat jak vodivé, tak nevodivé materiály s vysokým rozlišením až na atomární úrovni. Další výhodou této metody je, že povrchy, které zobrazuje, mohou být v různém prostředí (vzduch, voda a jiné kapaliny, vakuum, fázové rozhraní) a zároveň umožňuje sledovat dynamické jevy v reálném čase [81]. Nejvíce se využívá zobrazení topografie vzorku, dále pak fázové zobrazení nebo sledování mechanických vlastností [82]. Síly, které působí mezi hrotem a vzorkem jsou nejčastěji Van der Waalsovy síly, jako síly přitažlivé a odpuzivé síly plynoucí z Pouliho principu [80]. Závislost meziatomárních sil na vzdálenosti hrotu a vzorku je možné vidět na Obrázku 15.



Obrázek 15: Závislost meziatomárních sil na vzdálenosti hrotu a vzorku [76]

AFM se skládá ze čtyř hlavních částí: raménko s ostrým hrotem, které je usazeno do piezoelektrického skeneru, který raménko řídí, laserová dioda a detektor, který je citlivý k poloze [83]. Jednotlivé části jsou znázorněny na Obrázku 16.



Obrázek 16: Schéma AFM [83]

AFM je založena na měření atomárních sil mezi hrotem, který rastruje povrch, a povrchem zkoumaného vzorku. Hrot má špičku o průměru 10 nm a je vyroben nejčastěji z křemíku nebo nitridu křemíku, je umístěn na raménku (cantilever). Raménko je 100 až 200 μm dlouhé [76][77]. Tento hrot se pohybuje v blízkosti vzorku, popřípadě se daného vzorku dotýká. Dochází k přitahování nebo odpuzování hrotu vzorkem [78]. Působením atomárních sil vzniká ohyb raménka. Ohnutí raménka je zaznamenáváno citlivým detektorem, převážně to bývá pomocí laserového paprsku dopadajícího na fotodiodu [76][79]. Pohyb hrotu je možný ve všech třech osách (x, y, z).

Nejčastějším uspořádáním AFM je experimentální uspořádání. Zde je laserový paprsek nasměrován na raménko. Paprsek se odrazí od raménka a je zachycen detektorem s fotodiódou [82].

2.3.1 Síly působící v AFM

Měření AFM je ovlivněno působením mnoha sil fyzikální podstaty, které ovlivňují obraz vzorku. Detekce pomocí raménka je založena na principu Hookova zákona, který je definován následující rovnicí (1).

$$F = -k \cdot z \quad (1)$$

V této rovnici vyjadřuje písmeno F sílu, působící na raménko. Hodnota k je konstanta tuhosti raménka a z je vertikální výchylka raménka. Toto umožňuje měření sil, které působí na raménko i ve směru osy z [84]. Síly působící při AFM se rozdělují podle účinku hrot–vzorek na síly dlouhého a krátkého dosahu.

2.3.1.1 Van der Waalsovy síly

Mezi tyto síly řadíme Coulombickou sílu. Coulombická síla způsobuje polaritu molekul. Dále do této skupiny řadíme indukční sílu, při níž trvale polarizovaná molekula polarizuje zbylé molekuly, a disperzní sílu, při které vzniká dipól, jež je důsledkem oscilace. Síly mají původ v nerovnovážném šíření náboje elektronů. Nejvíce tyto síly působí ve vzdálenosti 0,1–100 nm [76][85]. Van der Waalsovy síly patří mezi síly s dlouhým dosahem [87].

2.3.1.2 Kapilární síly

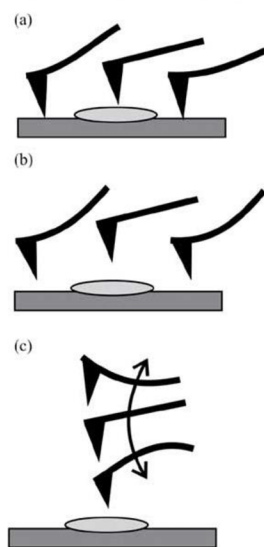
Díky tomu, že je hrot v blízkosti vzorku, dochází k mikrokontaktu a ten vytvoří počátek pro kondenzaci kapalin. Dochází ke vzniku menisku kolem hrotu AFM [76].

2.3.1.3 Síly krátkého dosahu

Pokud se vzorek a hrot přiblíží příliš, začne na atomy působit odpudivá síla. Odpudivé síly jsou způsobeny překryvem elektronových obalů atomu. Síly krátkého dosahu vycházejí z Pouliho principu. Vazebné síly mezi hrotem a vzorkem se nazývají chemisorbce a fyzisorbce a vytvářejí zde vazebné interakce. Tyto interakce mohou způsobit tření, dále též elastickou a plastickou deformaci [76][87].

2.3.2 Možnosti měření

Existuje několik režimů pro měření interakce vzorku s hrotem. Mezi základní patří kontaktní, nekontaktní a pokleповý režim (Obrázku 17) [76].



Obrázek 17: Možné režimy měření: a) kontaktní režim b) nekontaktní režim c) pokleповý režim [88]

2.3.2.1 Kontaktní režim

Kontaktní režim je ovlivňován odpudivými silami. V kontaktním režimu musí mít hrot s raménkem tuhost nižší, než je vazebná síla mezi atomy vzorku. Pokud by bylo použito raménko, které má vyšší tuhost, došlo by k posunu vzorku. Ohyb raménka je způsoben působícími silami. Míra ohybu raménka je úměrná změnám v topografii povrchu vzorku.

Mimo odpudivé síly působí v kontaktním režimu i kapilární síly, ty vznikají povrchovým

napětím, a síly, které se vytvářejí v raménku. Výsledná síla hrotu na vzorku je v rozmezí 10^{-8} N až 10^{-6} N [76]. Kontaktní režim je vhodný pouze pro tuhé vzorky, u měkkých vzorků by docházelo k znehodnocení vzorku [89]. Kontaktní režim je možno provádět ve dvou režimech. První režim pracuje s konstantní výškou, kdy je udržována konstantní výška z_0 a zaznamenává se ohyb raménka. Druhou možností je režim s konstantní silou. Při udržování konstantní síly se raménko udržuje konstantně ohnuté a dochází k posunu vzorku v ose z. Jelikož se při tomto módu vyhneme závislostem na kapilárních silách, je tento mód častěji v praxi využíván. Nevýhodou je ale, že je oproti módu s konstantní výškou pomalejší.

2.3.2.2 Nekontaktní režim

Při tomto režimu kmitá raménko s hrotem v blízkosti povrchu, obvyklá vzdálenost raménka od povrchu bývá 5–15 nm. Přitažlivá síla působící na raménko je v nekontaktním režimu způsobena Van der Waalsovými silami, popřípadě Coulombickými silami a interakcemi dipólů [83][90]. Výsledná síla, působící na hrot je 10^{-12} N [80]. Jelikož zde působí pouze slabé síly, je tento režim vhodný pro měkké a pružné povrchy [86][89].

Na hrot a raménko působí přitažlivá síla, a proto je nutné, aby raménko mělo vyšší tuhost, protože by mohlo dojít k poškození vzorku. Současně je na hrot vyvinuta malá síla a dochází poměrně k malému ohybu raménka. Raménko kmitá v blízkosti rezonanční frekvence s amplitudou v rozmezí nanometrů. Zaznamenává se změna rezonanční frekvence nebo amplituda kmitů raménka při oscilačním pohybu hrotu. V nekontaktním režimu se vzájemného působení účastní větší počet atomů a proto rozlišení, kterého lze dosáhnou, není příliš vysoké [76].

2.3.2.3 Pokleповý režim

Pokleповý režim je založen na kmitech raménka. Při tomto kmitání se hrot nedotýká vzorku, pouze se přibližuje do těsné blízkosti [89]. Pokud se raménko dostane do rezonanční frekvence, dojde k dotyku se vzorkem. Zaznamenává se změna amplitudy oscilace [80]. Nespornou výhodou tohoto režimu je možnost měření jak suchých vzorků, tak vzorků v kapalném prostředí [91].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem experimentální části byla příprava nasyntetizování oligonukleotidů s p53 cílovým místem a se strukturními motivy a následné stanovení jejich stability pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání v prostředí pěti iontů při čtyřech odlišných koncentracích a v prostředích s proteiny p53 a BSA ve čtyřech poměrech.

Součástí experimentu byla také produkce a izolace DNA vybraných plasmidů a následné sledování jejich struktury pomocí mikroskopie atomárních sil.

4 EXPERIMENTALNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- Agar (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Agaróza pro gelovou elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Akrylamid 19:1 (Serva, Heidelberg, SRN)
- Ampicilin (Biotika, Slovenská Ľupča, Slovensko)
- APS – peroxosíran amonný (TermoFisher, Waltham, USA)
- Bromfenolová modř (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- BSA – hovězí sérový albumin (SigmaAldrich, St. Louis, USA)
- Butanol (SigmaAldrich, St. Louis, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Penta, Chrudim, ČR)
- GelRed – fluorescenční barvivo (Biotium, Fremont, USA)
- Glycerol (SigmaAldrich, St. Louis, USA)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid draselný (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chlorid hořečnatý (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid vápenatý (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chlorid zinečnatý (Penta, Praha, ČR)
- Kyselina boritá (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina octová (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kvasinkový extrakt (SigmaAldrich, St. Louis, USA)
- Standard DNA (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- TEMED – Tetramethylethylenediamin (SigmaAldrich, St. Louis, USA)
- Tryptofan (SigmaAldrich, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze), (Penta, Praha, ČR)
- Xylencyanolová violet' (BDH Chemicals, Poole, UK)

4.1.2 Roztoky

- 50x TAE pufr (242 g Tris báze; 57,1 ml kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA; doplnit destilovanou vodou do 1 litru)
- 100x TE pufr (121 g tris báze, 37,2 g Na₂EDTA, pH 8, doplnit destilovanou vodou do 1 l)
- 5x TBE pufr (54 g Tris báze; 27,5 g kyseliny borité; 40 ml 0,5 M EDTA; doplnit destilovanou vodou do 1 litru)
- AFM pufr (0,373 g KCl, 0,476 g MgCl₂, 0,953 g HEPES pH 7,6)
- LB medium (10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 10 g NaCl, doplnit destilovanou vodou do 1 litru)
- LB agar (LB medium, 1,5% agaróza)
- Nanášecí pufr 6x LB (40 % sacharózy, 0,2 % bromfenolové modři, 0,2 % xylencyanolové violeti)
- SOC medium (2 % tryptofanu, 0,5 % kvasinkového extraktu, 0,58 g NaCl, 1,87 mg KCl, 1,2 g MgSO₄, 0,95 g MgCl₂, 3,6 g glukózy)

- Vazebný pufr 20x BB (7,455 g KCl; 1,21 g Tris pH 7,6; 0,2 % Tritonu)
- 1M ZnCl₂ (136,31 mg ZnCl₂ + 1 ml H₂O)
- 2M CaCl₂ (142,02 mg CaCl₂ · 2H₂O + 1 ml H₂O)
- 2M MgCl₂ (406,6 mg MgCl₂ · 6 H₂O + 1 ml H₂O)
- 2M KCl (147,8 mg KCl + 1 ml H₂O)
- 2M NaCl (116,9 mg NaCl + 1ml H₂O)

4.1.3 Použité přístroje

- Analytické váhy (XS105 DualRange, METTLER TOLEDO)
- AFM/STM Multimode 8 (Veeco, USA)
- Běžné laboratorní sklo
- Centrifuga: Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga: MiniSpin®Plus (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- LightCycler® Nano Instrument (Roche, Basel, Švýcarsko)
- Mikrocentrifuga (miniSpin plus, Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikropipety (Biologicals, Praha, ČR)
- Mikropitety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrovlnná trouba (Sencor SMW 3717)
- NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometr (Termo Scientific, USA)
- Termoblok (Grant QBT2, Grant Instruments)
- Transluminátor (UVT-328 MP)
- Třepačka ES-20 (BioSan, Riga, Litva)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborarough, UK)
- Zdroj pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Zařízení pro SDS-PAGE BIO-RAD (Biomax Corporation, Chandigarh, Indie)

4.1.4 Syntetické oligonukleotidy

Vybrané oligonukleotidy byly vytvořeny firmou IDT-Integrated DNA Technologies a Eurofines Genomics. Požadované struktury byly připraveny hybridizací oligonukleotidů (Tabulka 1), které byly značeny FAM značkou. Oligonukleotidy byly poskytnuty Biofyzikálním ústavem Akademie věd České republiky.

- Jednořetězcová struktura DNA byla připravena hybridizací řetězce triplex dA50. Dále používáno označení polyA.
- Dvouřetězcová DNA o velikosti 32 bp byla připravena hybridizací dvou řetězců linBRCA a linBRCB. Dále používáno označení linBRCA.
- Dvouřetězcová DNA o velikosti 50 bp byla připravena hybridizací dvou řetězců p53con(pPGM3)-A a p53con(pPGM3)-B. Dále používáno označení p53con.
- Kvadruplexová struktura DNA byla připravena hybridizací řetězce hTel51. Dále používáno označení hTel.
- Křížová struktura DNA byla připravena hybridizací čtyř řetězců junctiBRC-A, junctiBRC-B, junctiBRC-C, junctiBRC-D. Dále používáno označení junctiBRCA.

Tabulka 1: Sekvence oligonukleotidů použité k hybridizaci

název	sekvence 5'-3'	3' modifikace
triplex dA50	AA	/36-FAM/
junctionBRC-A	GAATTCAGCACGAGTCTTAACGCCAGATCT	
junctionBRC-B	AGATCTGGCGTTAGGTGATACCGATGCATC	
junctionBRC-C	CACTAGTCGTAAGCCACTCGTGCTGAATTC	/36-FAM/
junctionBRC-D	CATGCATCGGTATCAGGCTTACGACTAGTG	
LinBRC-A	CCCTCGGAGCACTGCACAACCCCTGGCCGCCG	/36-FAM/
LinBRC-B	CGGCGCCAGGGGTTGTGCAGTGTCCGAGGG	
p53con(pPGM3)-A	CCCTCGAGGCATGCCTAGGCATGCCTCCGCC	/36-FAM/
p53con(pPGM3)-B	GGGCGGAGGCATGCCTAGGCATGCCTCGAGGG	
hTel51	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	/36-FAM/

4.1.5 Proteiny

Pro účely této práce byl použit protein p53 v plné délce (wt). Dále byl využit protein BSA, který sloužil jako negativní kontrola. Tyto proteiny byly využity při HRM analýze.

4.1.6 Plasmidy

Pro práci byl naizolován plasmid pBluescript (pBl), pPGM1 a p3MYC které jsou odvozeny od pBl, dále byly naizolované nové plasmidy a to pGL4·10, pGL4·10-hiFC, pGL4·10-hiFG, pGL4·10-ILC, pGL4·10-ILG. Všechny tyto plasmidy byly poskytnuty Biofyzikálním ústavem Akademie věd České republiky.

4.2 Metody

4.2.1 Hybridizace oligonukleotidů

Bylo připraveno 5 hybridizovaných vzorků oligonukleotidů po 50 μ l. Pro přípravu vzorku LinBRCA a p53con byly použity dva oligonukleotidy (viz Tabulka 1). Množství jednotlivých složek bylo 5 μ l oligonukleotidu 1 + 5 μ l oligonukleotidu 2 + 2,5 μ l 20x BB + 37,5 μ l H₂O. Pro oligonukleotid triplex dA50 a hTel51 bylo napipetováno 5 μ l oligonukleotidu + 2,5 μ l 20x BB + 42,5 μ l H₂O. Pro hybridizaci junctionBRCA bylo využito čtyř oligonukleotidů podle Tabulky 1. Směs byla připravena z 5 μ l oligonukleotidu 1 + 5 μ l oligonukleotidu 2 + 5 μ l oligonukleotidu 3 + 5 μ l oligonukleotidu 4 + 2,5 μ l 20x BB + 27,5 μ l H₂O.

Takto připravené vzorky byly vloženy do termobloku, kde byla teplota 95 °C, byly zde ponechány 5 minut. Dále byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě po dobu 16 hodin, kdy docházelo k hybridizaci.

Následně byly připraveny kontrolní vzorky oligonukleotidů. Byl použit vždy jeden nehybridizovaný oligonukleotid z každé hybridizační skupiny, a to konkrétně ten, který obsahuje fluorescenční značku. 1 μ l značeného oligonukleotidu byl rozpuštěn v 9 μ l 1x TE pufru. Tyto vzorky byly zamrazeny a použity jako kontrolní vzorky při gelové elektroforéze na polyakrylamidovém gelu.

4.2.2 Separace oligonukleotidů pomocí polyakrylamidové gelové elektrofozý (PAGE)

Separace oligonukleotidů byla provedena elektroforeticky na polyakrylamidovém gelu. Hustota gelu byla stanovena na 20% spodní vrstvu, sloužící jako zátka, a 4% vrchní separační vrstvu gelu. Oba gely byly připraveny podle Tabulka 2. Roztoky ASP a TEMED byly přidány do směsi až těsně před nalitím. Spodní vrstva gelu byla nalita mezi připravená skla a přelita butanolem a ponechána 30 minut tuhnout. Poté byl butanol odsát a byla nalita horní vrstva gelu až po okraj skel. Následně byl mezi skla do horní vrstvy gelu zasazen hřebínek. Tato

vrstva byla opět ponechána tuhnout 30 minut. Po ztuhnutí byl gel přemístěn do aparatury pro SDS-PAGE a zalit roztokem 0,33x TBE a 0,5 mM KCl. Hřebínek byl opatrně vyjmut. Jednotlivé starty byly promyty roztokem, který byl použit na zalití.

Tabulka 2: Složení jednotlivých částí gelu pro SDS-PAGE

	Zátka 10 ml	Separáční gel 20 ml
Slo�en�	20%	4%
akrylamid 19:1	5 ml	2 ml
0,33x TBE	0,41 ml	0,33 ml
30 Mm KCl	0,2 ml	165 �l
H ₂ O	4,39 ml	17,5 ml
APS	62,5 �l	50 čl
TEMED	25 �l	20 čl

Vzorky hybridizovaných i nehybridizovaných oligonukleotidů pro separaci byly připraveny podle Tabulka 3. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 12  l vzorku. Elektroforéza probíhala po dobu 150 minut při 50 V. Po skončení elektroforézy byly vzorky analyzovány na UV transluminátoru, kter  byl snímán CCD kamerou, na p stroji LAAS 3000.

Tabulka 3: Slo en  směsi pro SDS-PAGE

Oligonukleotid	Množství oligonukleotidu [�l]	20x BB [�l]	H ₂ O [�l]	6xLB [�l]
poly a (FAM)	1	0,5	8,5	2
poly a (hybrid.)	1	0,5	8,5	2
junctiBRC-C (FAM)	1	0,5	8,5	2
junctiBRCA (hybrid.)	1	0,5	8,5	2
linBRC-A (FAM)	1	0,5	8,5	2
linBRC-A (hybrid.)	1	0,5	8,5	2
p53con-A (FAM)	1	0,5	8,5	2
p53con (hybrid.)	1	0,5	8,5	2
hTel51 (FAM)	1	0,5	8,5	2
hTel51 (hybrid.)	1	0,5	8,5	2

4.2.3 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Hybridizovan  oligonukleotidy byly naředěny na koncentraci 400 nM (p53con) a 1  M (LinBRCA). Tyto oligonukleotidy byly analyzovány v prostředí pěti iontů (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺) o  tyrech koncentracích iontu. Směsi pro HRM o objemu 10  l byly připraveny dle Tabulka 4 a byly podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání. Ve ker  měření proběhla ve  tyrech opakováních.

Tabulka 4: Množství jednotlivých komponent směsi iontu s oligonukleotidem pro HRM

Koncentrace iontu [mM]	0	2	8	32
Množství DNA [μ l]	5	5	5	5
Množství H ₂ O [μ l]	5	4,6	3,4	4,36
Množství iontu [μ l]	0	0,4	1,6	0,44

Následně byly proměřeny pomocí HRM tyto oligonukleotidy s přidavkem proteinu p53 a BSA. Směs oligonukleotidu p53con s proteinem p53 byla připravena dle Tabulka 5. Následně byla připravena obdobná směs oligonukleotidu p53con s proteinem BSA. Protein BSA sloužil jako negativní kontrola. Množství jednotlivých komponent bylo pipetováno podle Tabulka 6.

Tabulka 5: Množství jednotlivých komponent směsi oligonukleotidu p53con a proteinu p53 pro HRM

p53con [400 nM]				
Poměr protein:DNA	0:1	1:1	2:1	4:1
Množství DNA [μ l]	5	5	5	5
Množství proteinu p53 [μ l]	0	0,27	0,54	1,08
Množství H ₂ O [μ l]	4,5	4,23	3,96	3,42
Množství 20x BB [μ l]	0,5	0,5	0,5	0,5

Tabulka 6: Množství jednotlivých komponent směsi oligonukleotidu p53con a proteinu BSA pro HRM

p53con [400 nM]				
Poměr protein:DNA	0:1	1:1	2:1	4:1
Množství DNA [μ l]	5	5	5	5
Množství proteinu BSA [μ l]	0	0,13	0,27	0,53
Množství H ₂ O [μ l]	4,5	4,37	4,23	3,97
Množství 20x BB [μ l]	0,5	0,5	0,5	0,5

Připravené směsi byly krátce zcentrifugovány a na cykleru LightCycler® Nano Instrument byl spuštěn program pro HRM analýzu. Nastavení programu pro HRM bylo provedeno dle Tabulka 7. Měření proběhlo ve čtyřech opakováních.

Tabulka 7: Program pro HRM analýzu

Iniciační fáze		Finální fáze	
teplota [°C]	40	teplota [°C]	97
ramp [°C/s]	1	ramp [°C/s]	0,1
hold [s]	40	hold [s]	1

4.2.4 Příprava kompetentních buněk

10 ml bakteriálních kultur buněk *E. coli* kmene STBL4 bylo kultivováno v LB mediu ve 100 ml Erlenmayerových baňkách přes noc při 37 °C. Následně byl 1 ml bakteriální kultury přenesen za stálého míchání do 50 ml LB media v 500 ml Erlenmayerově baňce. Kultura byla třepána po dobu 3 hodin při 37 °C do optické hustoty 0,5–0,7. Poté byl obsah baňek převeden do 50 ml zkumavek a inkubován 10 minut na ledu a centrifugován 10 minut při 6000 x g. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 10 ml vychlazeného 0,1 M CaCl₂. Byla provedena inkubace po dobu 25 minut na ledu a následně centrifugace 10 minut při 6000 x g. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 1 ml roztoku CaCl₂. Do suspenze bylo přidáno 0,2 ml sterilního glycerolu. Směs byla na ledu rozdělena po 100 µl alikvótech do sterilních eppendorfek a ty byly umístěny na led a přeneseny do mrazáku na -80 °C.

4.2.5 Transformace do kompetentních buněk (STBL4)

Plasmidová DNA byla transformována do bakteriálních buněk *E. coli* kmene STBL4. Z mrazáku -80 °C byly vyndány na led kompetentní buňky a ponechány na ledu 15 minut. Do vysterilovaných eppendorfek bylo rozpipetováno po 50 µl suspenze kompetentních buněk.

Poté bylo ke kompetentním buňkám přidáno po 50 ng plasmidu. Proběhla inkubace po dobu 30 minut na ledu, poté byly vzorky přesunuty do termobloku předeřátého na 42 °C na 45 s. Vzápětí byly vzorky přesunuty na led, kde byly ponechány 2 minuty.

Následně bylo přidáno 250 µl SOC media, které bylo předeřáto. Eppendorfky byly umístěny do termobloku, který byl vyhřátý na teplotu 37 °C. Třepány byly po dobu 1 hodiny při 300 rpm. Po 100 µl kultury bylo vyseto hokejkou na Petriho misky s LB agarem a ampicilinem v poměru 1000:1. Inkubace proběhla při 37 °C po dobu 24 hodin.

4.2.6 Kultivace bakteriálních buněk *E. coli*. STBL4

Buňky byly nabrány sterilní špičkou z Petriho misky a umístěny do falkony s 5 ml LB media a ampicilinem. Kultivace probíhala 24 hodin při 37 °C na třepačce při 300 ot/min.

4.2.7 Izolace plasmidové DNA

5 ml buněk kultivovaných v LB mediu bylo centrifugováno po dobu 5 minut při 11 000 ot/min. Supernatant byl odlit. Izolace byla provedena pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid. K peletu bylo přidáno 250 µl pufru A1 (uchováváno na ledu). Obsah zkumavky byl resuspendován do vzniku homogenní suspenze.

Do zkumavky bylo přidáno 250 µl pufru A2, obsah byl opatrně promíchán převrácením zkumavky 6–8krát. Následně bylo do zkumavky přidáno 300 µl neutralizačního pufru A3, obsah byl opatrně promíchán převrácením zkumavky 6–8krát. Zkumavka byla centrifugována po dobu 5 minut při 11 000 ot/min.

Supernatant byl opatrně přepipetován do druhé zkumavky, která obsahovala kolonku. Zkumavka byla centrifugována při 11 000 ot/min po dobu 1 minuty. Supernatant byl odlit a na kolonku bylo napipetováno 600 µl promývacího pufru A4. Zkumavka byla centrifugována 1 minutu při 11 000 ot/min. Tento krok byl zopakován.

Kolonka s filtrem byla opatrně přesunuta do nové zkumavky. Na filtr bylo napipetováno 50 µl elučního pufru AE. Zkumavka byla centrifugována při 11 000 ot/min po dobu 1 minuty. Ze zkumavky byla odstraněna kolonka a eluát obsahující DNA byl ponechán.

4.2.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty plasmidové DNA

Absorbance izolované DNA v AE pufru byla proměřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop 2000. Všechny vzorky byly před měřením zvortexonány. Jako referenční vzorek byl použit eluční pufr AE. Na čočku byl nanášen objem vzorků 1 μ l. Měření probíhalo v rozmezí 230 až 320 nm. Přístrojem byla stanovena koncentrace DNA (z hodnot absorbance při 260 nm) a poměr hodnot absorbancí, vypovídající o čistotě DNA, A_{260}/A_{280} .

4.2.9 Agarósová gelová elektroforéza plasmidové DNA

Do Erlenmayerovy baňky byl připraven 1% agarózový gel. Bylo naváženo 0,53 g agarózy a bylo přidáno 1 μ l 50x koncentrovaného TAE. Následně stříčkou byla přidána voda zhruba na 50 ml. Směs byla zahřata v mikrovlnné troubě, aby došlo k rozpuštění agarózy. Takto připravená směs byla ochlazená zhruba na 60 °C a byl přidán 1 μ l barviva GelRed. Následně byla směs přelita do připravené vaničky s hřebínkem a ponechána tuhnout. Po úplném ztuhnutí byl hřebínek opatrně vytáhnout. Do sterilních Eppendorfových zkumavek byly připraveny vzorky pro elektroforézu (dle Tabulka 8). Pro přípravu směsi byla použita plasmidová DNA o koncentraci 100 ng/ μ l.

Vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany a přelita 1x TAE puftrem. Do jednotlivých jamek na gelu bylo napipetováno 12 μ l připravené směsi. Elektroforéza probíhala po dobu 90 minut při 110 V. Po ukončení elektroforézy byl gel pozorován na transluminátoru pod UV zářením o vlnové délce 305 nm. Byla provedena fotografická dokumentace.

Tabulka 8: Složení jednotlivých směsí pro elektroforézu

Plasmid	DNA [μ l]	H ₂ O [μ l]	Nanášecí pufr [μ l]
pB1	0,99	9,01	2
pPGM1	0,91	9,09	2
p3MYC	3,98	6,02	2
pGL4·10	3,02	6,98	2
pGL4·10-hifC	0,85	9,15	2
pGL4·10-hifG	0,77	9,23	2
pGL4·10-ILC	1,13	8,87	2
pGL4·10-ILG	0,61	9,39	2

4.2.10 Příprava vzorků pro AFM

Byly vybrány plasmidy pGL4·10, hif-C a ILC. Tyto plasmidy byly naředěny na koncentraci 1 ng/ μ l za použití AFM pufru (Tabulka 9), který byl před použitím přefiltrován přes 0,2 μ m filtr.

Tabulka 9: Množství plasmidu a AFM pufru pro naředění na koncentraci 1 ng/μl

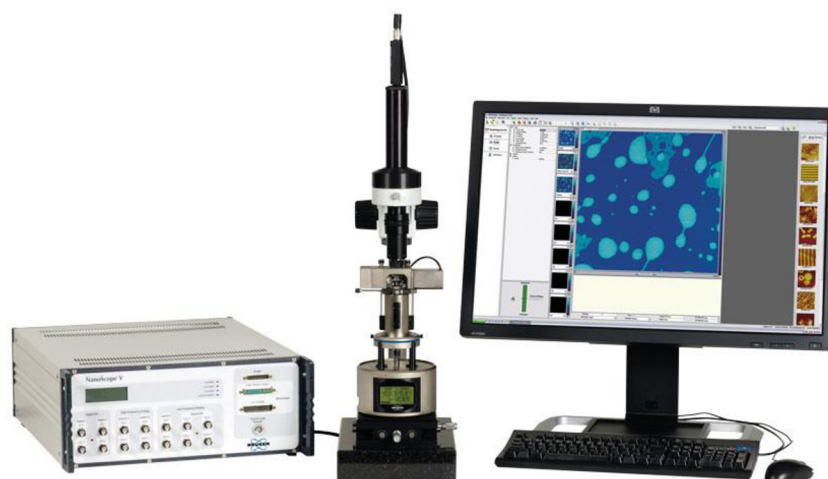
Plasmid	Výchozí koncentrace plasmidu [ng/μl]	Množství plasmid [μl]	Množství AFM pufru [μl]
pGL4·10	25,1	0,6	19,4
ILC	88,3	0,23	19,77
hif-C	117,5	0,17	19,83

Pro měření byla použita slída MUSCOVITE MICA V4 QUALITY. Slída byla následně nalepena na kovovou destičku o průměru 15 mm. Opakovaným strháváním svrchních vrstev pomocí lepicí pásky byla slída zbavena nečistot a zároveň byl povrch slídy zarovnan. Na takto připravenou slídu byl následně nanesen vzorek.

4 μl vzorku, který byl naředěn v AFM pufru, byly nanесeny na připravenou slídu. Slída se vzorkem se nechala 2 minuty inkubovat při laboratorní teplotě. Následně byla slída se vzorkem opláchnuta 1 μl destilované vody, která byla také přefiltrována přes 0,2 μm filtr. V zápětí byl vzorek vysušen stlačeným vzduchem. Takto připravený vzorek je možno skenovat na AFM.

4.2.11 Příprava AFM mikroskopu před měřením

Měření byla prováděna na zařízení AFM/STM Multimode 8 electrochemical systém od firmy Veeco (Obrázku 18). Pro tuto práci byly použity hroty SCANASYST – AIR, které vyrábí firma Bruker. K práci byl využit program Nanoscope 8.15. V tomto programu byl vybrán režim ScanAsyst in Air, který pracuje v pokleповém režimu. Režim ScanAsyst automaticky optimalizuje zobrazovací parametry i naměřené hodnoty.



Obrázek 18: AFM/STM Multimode 8 electrochemical [92]

Po vložení destičky se slídou byl nastaven laser tak, aby paprsek dopadal na raménko a zrcadla byla nastavena tak, aby byl paprsek laseru odražen na fotodiodu. Poté mohlo být zahájeno měření. Získané obrázky byly upraveny pomocí programu Gwyddion.

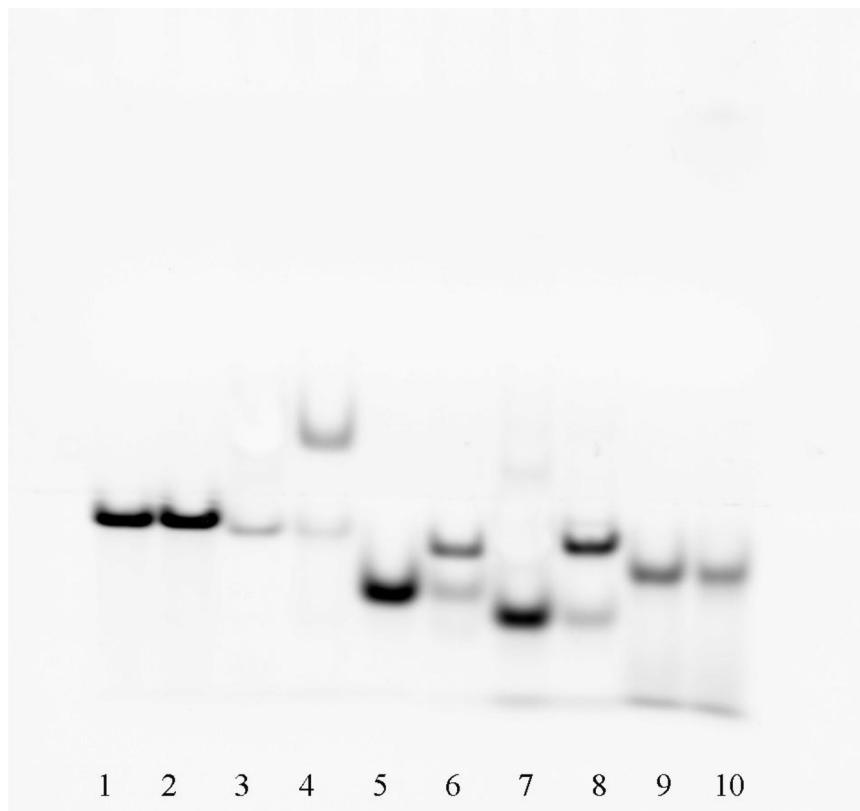
4.2.12 Sledování struktury izolovaných plasmidů pomocí AFM

Byla sledována struktura vybraných plasmidů – pGL4·10, pGL4·10-hifC a pGL4·10-ILC. Od každého plasmidu byla vytvořena sada obrázků. Pomocí metody AFM bylo sledováno, zda se tvoří superhelikální DNA, nebo zda vzniklo v molekule překřížení, popřípadě zda se v molekule vyskytuje křížová struktura.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Polyakrylamidová gelová elektrofozéma (PAGE)

Při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu dochází k dělení oligonukleotidů podle molekulové hmotnosti. Postup je popsán v kapitole 4.2.2. Úkolem byla kontrola vzniklých hybridních struktur. Toho bylo docíleno tím, že byl na gel nanesen jak vzorek hybridizovaných oligonukleotidů, tak vzorek nehybridizovaných oligonukleotidů, a byla porovnána jejich mobilita. Jelikož hybridizací vznikají komplexy s vyšší molekulovou hmotností, je mobilita těchto sloučenin v gelu nižší než mobilita jednořetězcových oligonukleotidů.



Obrázku 19: Gel s hybridizovanými i nehybridizovanými oligonukleotidy. Pořadí vzorků
1) poly A nehybridizován 2) poly A hybridizován 3) *junctionBRC-A* nehybridizován
4) *junctionBRCA +B+C+D* hybridizován 5) *LinBRCA* nehybridizován 6) *LinBRC-A+linBRC-B* hybridizován 7) *p53con A* nehybridizován 8) *p53con A+B* hybridizován
9) *hTel51* nehybridizován 10) *hTel51* hybridizován

Jak je patrné z Obrázku 19, veškeré oligonukleotidy, které byly hybridizovány s komplementárními sekvencemi, mají nižší mobilitu, než je mobilita nehybridizovaných jednořetězcových DNA. V případě dvojic oligonukleotidů poly A a hTel51 je migrace nehybridizovaných a zhybridizovaných oligonukleotidů stejná, jelikož pro hybridizaci byl použit pouze jeden řetězec oligonukleotidu (viz Tabulka 1).

Podle výsledků SDS-PAGE byly pro HRM analýzu vybrány oligonukleotidy *LinBRCA*, *p53con*, a *hTel51*.

5.2 HRM analýza oligonukleotidů s vybranými ionty

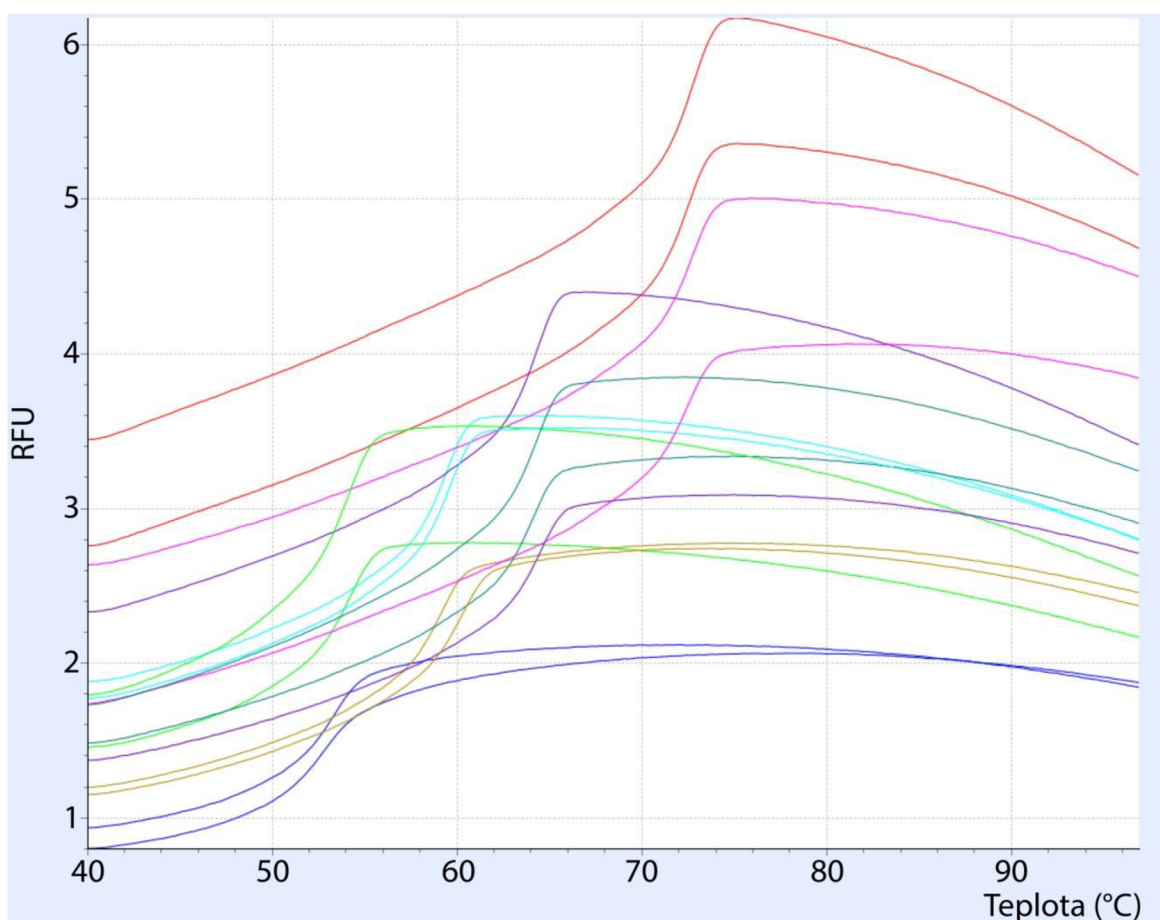
Zvolené oligonukleotidy byly vystaveny působení pěti různých iontů. Konkrétně

byly vybrány Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} . Měření probíhalo při čtyřech koncentracích iontů, konkrétně při 0, 2, 8, 32 mM.

Analýzou křivek tání s vysokým rozlišením byla u jednotlivých vzorků oligonukleotidů určena teplota tání v závislosti na iontovém prostředí (kapitola 4.2.4.). Pro lepší přehlednost byly vzniklé křivky tání převedeny na diferenciální křivky. Vzniklé píky odpovídaly teplotám tání. Jelikož byla jednotlivá měření prováděna ve čtyřech opakováních, byl z těchto hodnot vypočten průměr.

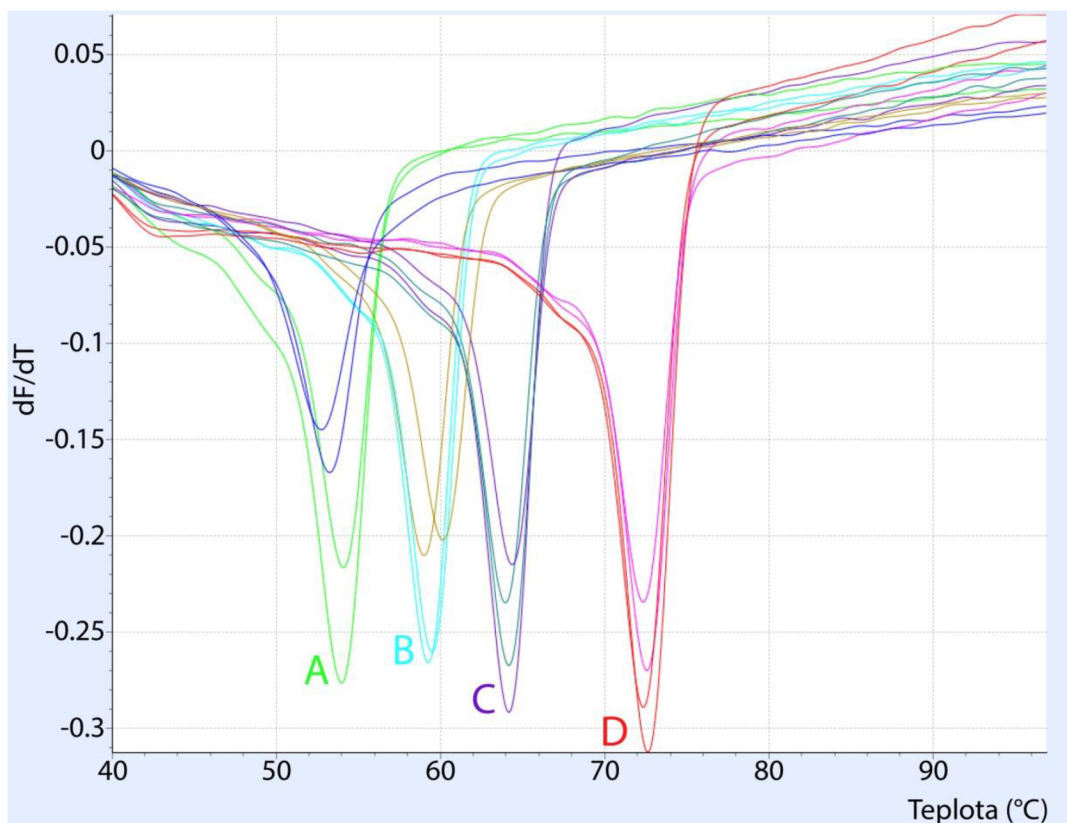
5.2.1 HRM analýza oligonukleotidu p53con s vybranými ionty

Byla provedena HRM analýza oligonukleotidu p53con v prostředí pěti vybraných iontů. Koncentrace oligonukleotidu byla pro všechny vzorky 400 nM. Pro příklad je uveden vzorový obrázek křivek tání oligonukleotidu p53con v přítomnosti iontu K^+ o různých koncentracích (Obrázek 20).



Obrázek 20: Vzorový obrázek křivek tání. Jedná se o oligonukleotid p53con s iontem K^+ při koncentraci 0, 2, 8, 32 mM

Křivky tání (Obrázek 20), které vznikly nebyly příliš přehledné, a proto se pro určení teplot tání využily diferenciální křivky (Obrázek 21). Po derivaci křivek tání vznikly píky, které odpovídaly teplotám tání.

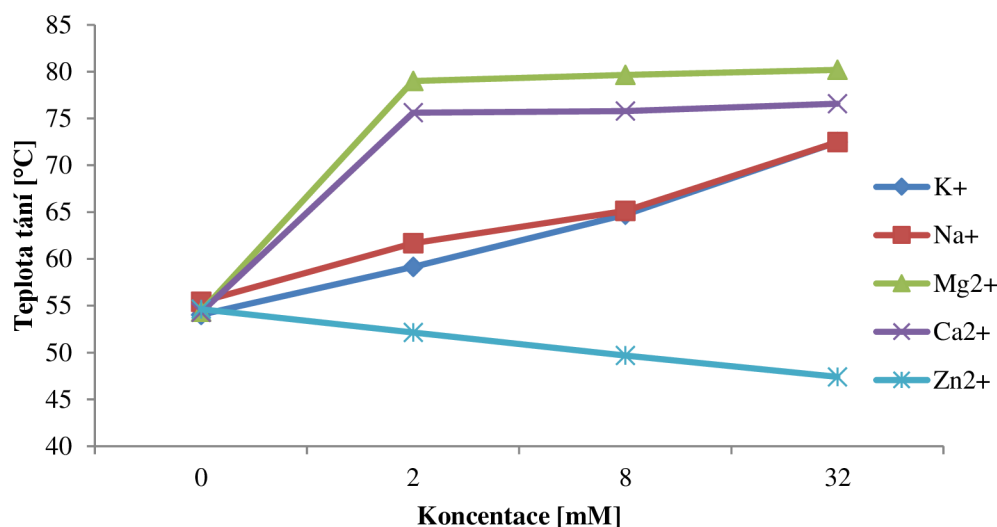


Obrázek 21: Diferenční křivky tání oligonukleotidu p53con s iontem K^+ . Jednotlivé píky odpovídají teplotám tání při koncentraci A) 0 mM B) 2 mM C) 8 mM D) 32 mM tohoto iontu.

Tyto teploty jsou uvedeny v Tabulka 10. Pro lepší přehlednost byl z naměřených hodnot sestaven graf (Obrázek 22).

Tabulka 10: Průměrné teploty tání oligonukleotidu p53con s ionty Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}

Oligonukleotid p53con					
Koncentrace iontu [mM]	Teplota tání [°C]				
	K^+	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Zn^{2+}
0	$54,04 \pm 0,37$	$54,06 \pm 1,24$	$54,37 \pm 0,12$	$54,29 \pm 0,41$	$54,63 \pm 0,11$
2	$59,48 \pm 0,42$	$61,14 \pm 0,99$	$79,02 \pm 0,08$	$75,61 \pm 0,14$	$52,14 \pm 0,50$
8	$64,17 \pm 0,15$	$65,21 \pm 0,32$	$79,65 \pm 0,07$	$75,80 \pm 0,26$	$49,7 \pm 0,19$
32	$72,48 \pm 0,12$	$72,48 \pm 0,45$	$80,19 \pm 0,16$	$76,58 \pm 0,13$	$47,41 \pm 0,42$



Obrázek 22: Grafické zpracování Tabulky 10. Znázorňuje závislost teploty tání oligonukleotidu p53con na koncentraci vybraných iontů

Na Obrázku 22 je znázorněna změna teploty tání oligonukleotidu v závislosti na měnící se koncentraci iontů Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺. Z obrázku je patrné že jednomocné ionty Na⁺ a K⁺ zvyšovaly teplotu tání oligonukleotidu s postupným zvyšováním koncentrace daného iontu K⁺ a Na⁺. Docházelo k postupnému nárůstu teploty tání až na teplotu 72,48 °C. Z toho, že dané ionty zvyšovaly teplotu tání, můžeme usuzovat že, docházelo ke stabilizaci oligonukleotidu. Dvojmocné ionty Mg²⁺ a Ca²⁺ zvyšovaly teplotu tání poměrně výrazně už při prvním navýšení koncentrace daných iontů. Při prvním navýšení koncentrace se teplota zvýšila s iontem Mg²⁺ na 79,02 °C a s iontem Ca²⁺ na 75,61 °C. Další navyšování koncentrace už nijak výrazně teplotu tání nezvyšovalo. Teplota tání se zvýšila s iontem Mg²⁺ na 80,19 °C a s iontem Ca²⁺ na teplotu 76,58 °C. Podobně jako u iontu Na⁺ a K⁺ i v tomto případě docházelo ke stabilizaci oligonukleotidu. Na rozdíl od předchozích iontů docházelo při interakci Zn²⁺ s oligonukleotidem p53con ke snižování teploty tání, což poukazuje na destabilizaci oligonukleotidu. Teplota tání klesla s postupným navyšováním koncentrace iontu až na teplotu 47,41 °C.

Jednomocné ionty K⁺ a Na⁺ se váží do malého žlábků a tím dochází ke stabilizaci molekuly DNA se zvyšující se koncentrací jednomocného iontu. Na rozdíl od jednomocných iontů dochází u dvojmocných iontů Mg²⁺ a Ca²⁺, ke stabilizaci terciární a kvartérní struktury DNA, a proto bylo patrné pozorováno navýšení teploty tání DNA už při velmi nízkých koncentracích. Zn²⁺, na proti tomu destabilizoval molekulu DNA patrně kvůli integraci s velkým žlábkem oligonukleotidu, kdy se ionty Zn²⁺ začlenily do DNA. To způsobilo pokles stability [93].

5.2.2 HRM analýza oligonukleotidu linBRCA s vybranými ionty

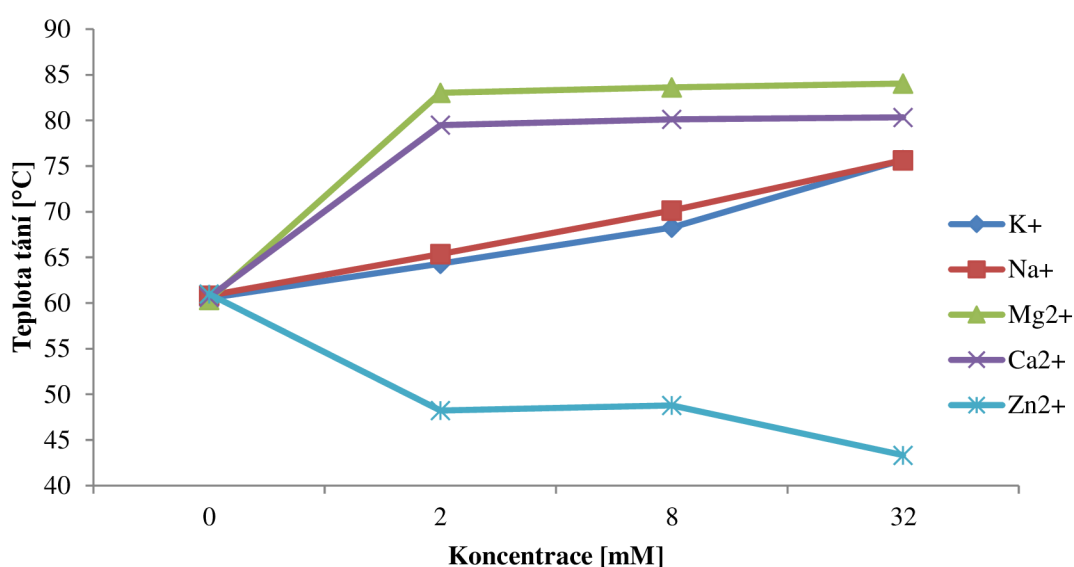
Byla provedena HRM analýza oligonukleotidu linBRCA v prostředí pěti vybraných iontů. Z důvodu nižší koncentrace oligonukleotidu byla v tomto případě upravena koncentrace na 1 μM. Z diferenčních křivek tání byly odečteny teploty tání jednotlivých vzorků.

Tyto teploty jsou uvedeny v Tabulka 11. Pro lepší přehlednost byl z naměřených hodnot

sestaven graf závislosti změn teplot tání na koncentraci iontů.

Tabulka 11: Průměrné teploty tání oligonukleotidu linBRCA při působení iontů Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}

Oligonukleotid linBRCA					
Koncentrace iontu [mM]	Teplota tání [°C]				
	K^+	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Zn^{2+}
0	$60,54 \pm 0,48$	$60,82 \pm 0,25$	$60,35 \pm 0,60$	$60,64 \pm 0,29$	$60,99 \pm 0,080$
2	$64,30 \pm 0,05$	$65,37 \pm 0,48$	$83,03 \pm 0,09$	$79,47 \pm 0,08$	$48,22 \pm 0,41$
8	$68,27 \pm 0,18$	$70,13 \pm 1,14$	$83,61 \pm 0,09$	$80,10 \pm 0,08$	$48,80 \pm 0,54$
32	$75,68 \pm 0,12$	$75,64 \pm 0,39$	$84,04 \pm 0,07$	$80,34 \pm 0,05$	$43,34 \pm 0,07$



Obrázek 23: Grafické zpracování Tabulky 11. Znázorňuje závislost teploty tání oligonukleotidu linBRCA na koncentraci vybraných iontů

Na Obrázku 23 je znázorněna změna teploty tání oligonukleotidu v závislosti na koncentraci iontů Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} . Z obrázku je patrné že jednomocné ionty Na^+ a K^+ zvyšovaly teplotu tání oligonukleotidu s postupným zvyšováním koncentrace daného iontu. Teplota se navýšila s iontem K^+ na $75,68 \text{ }^\circ\text{C}$ a s iontem Na^+ na $75,64 \text{ }^\circ\text{C}$. Z toho, že dané ionty zvyšovaly teplotu tání, můžeme usuzovat, že docházelo ke stabilizaci oligonukleotidu. Dvojmocné ionty Mg^{2+} a Ca^{2+} zvyšovaly teplotu tání poměrně výrazně už při prvním navýšení koncentrace daných iontů. Teplota tání se zvýšila s iontem Mg^{2+} na $83,03 \text{ }^\circ\text{C}$ a s iontem Ca^{2+} na teplotu $79,47 \text{ }^\circ\text{C}$. Další navyšování koncentrace už nijak výrazně teplotu tání nezvýšilo. Teplota tání se zvýšila s iontem Mg^{2+} na $84,04 \text{ }^\circ\text{C}$ a s iontem Ca^{2+} na teplotu $80,34 \text{ }^\circ\text{C}$. Podobně jakou iontu Na^+ a K^+ i v tomto případě docházelo ke stabilizaci oligonukleotidu. Na rozdíl od předchozích iontů, docházelo při spojení Zn^{2+} s oligonukleotidem linBRCA ke snižování teploty tání, což poukazuje na destabilizaci oligonukleotidu. Teplota tání se v tomto případě snížila na teplotu $43,34 \text{ }^\circ\text{C}$. Mechanismus,

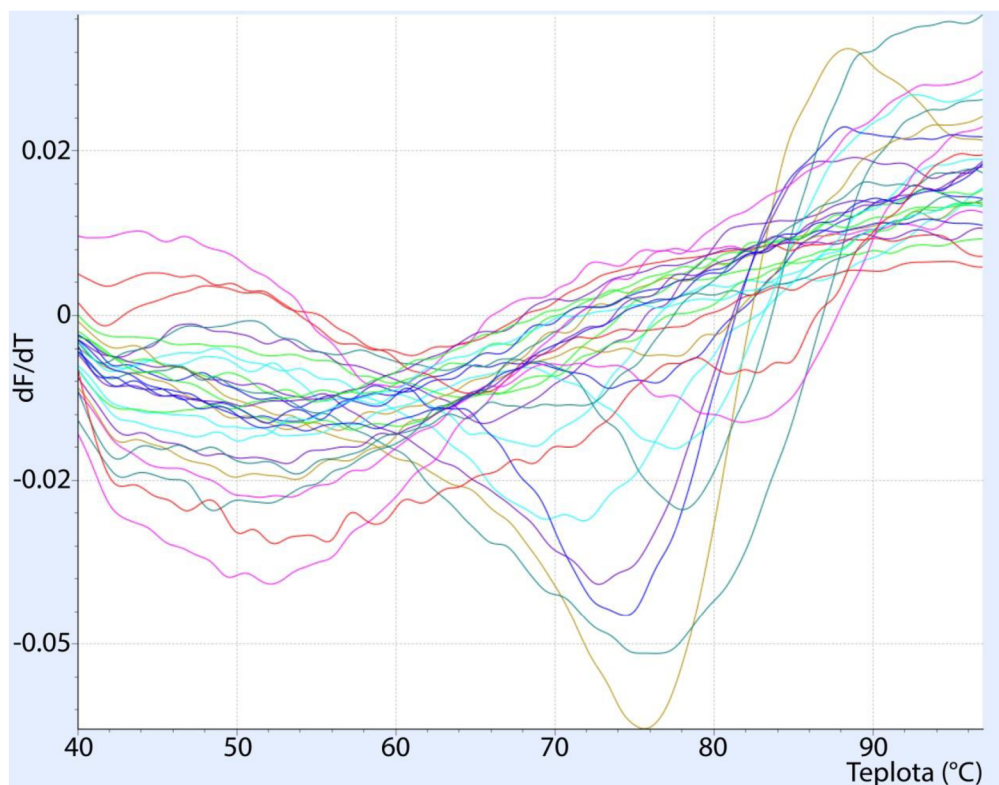
jakým vybrané ionty reagovaly s oligonukleotidem linBRCA je totožný s předešlým oligonukleotidem p53con. Rozdíl je pouze v teplotách tání, samotný oligonukleotid p53con má nižší teplotu tání, než oligonukleotid linBRCA. Od toho faktu se dále odvíjejí i rozdílné teploty se zvyšující se koncentrací iontů.

Jednomocné ionty K^+ a Na^+ se váží do malého žlábků a tím dochází ke stabilizaci molekuly DNA se zvyšující se koncentrací jednomocného iontu. Na rozdíl od jednomocných iontů dochází u dvojmocných iontů Mg^{2+} a Ca^{2+} , ke stabilizaci terciární a kvartérní struktury DNA, a proto bylo patrně pozorováno navýšení teploty tání DNA už při velmi nízkých koncentracích. Zn^{2+} , na proti tomu destabilizoval molekulu DNA patrně kvůli integraci s velkým žlábkem oligonukleotidu, kdy se ionty Zn^{2+} začlenily do DNA. To způsobilo pokles stability [93].

5.2.3 HRM analýza oligonukleotidu hTel s vybranými ionty

I pro tento oligonukleotid byly vzorky nachystány podle postupu, který je popsán v kapitole 4.2.4. Teploty tání pro tento oligonukleotid nebylo možné zjistit (Obrázek 24). Jelikož se při analýze HRM nevytvořily křivky, ze kterých by se dala odečíst teplota tání. Měření byla několikrát zopakována s různými ionty i s upravenou koncentrací daného oligonukleotidu. Dále byl oligonukleotid znovu nahybridizován a znovu proměřen s různými ionty. I přes to se nevytvořily křivky.

Důvodem může být fakt, že nevznikla při hybridizaci požadovaná struktura, popřípadě, že teplota, která byla využita při analýze ($97\text{ }^{\circ}\text{C}$), nebyla dostatečně vysoká, aby došlo k denaturaci této struktury.



Obrázek 24: HRM analýza oligonukleotidu hTel s ionty K^+ a Mg^{2+}

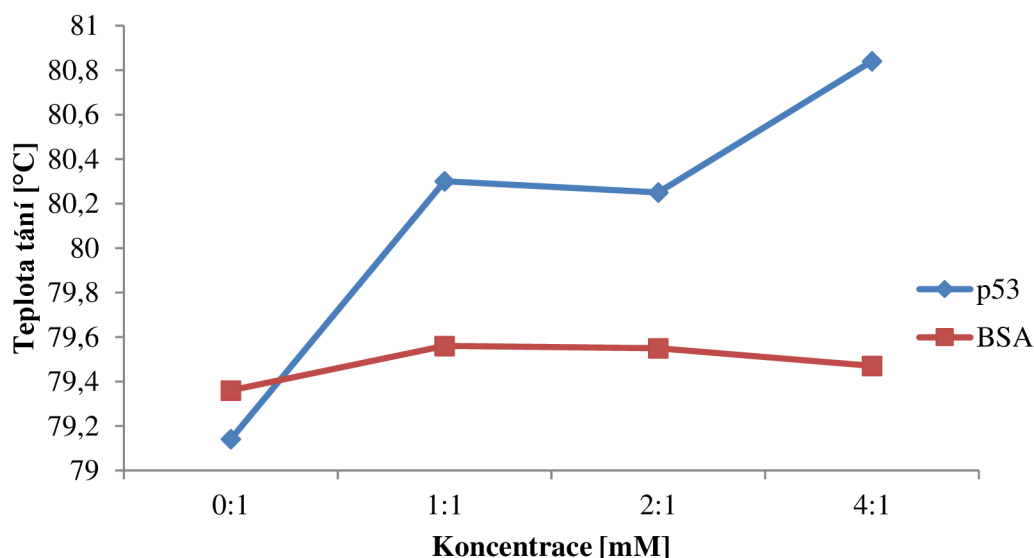
5.3 HRM analýza oligonukleotidu p53con s proteiny

Vzorky byly připraveny podle postupu, který je popsán v kapitole 4.2.4. K analýze byl využit oligonukleotid p53con, který obsahuje cílové místo pro navázání proteinu p53. Koncentrace oligonukleotidu byla 400nM. Protein BSA sloužil jako negativní kontrola. Protein byl k oligonukleotidu přidáván v poměru 0:1, 1:1, 2:1 a 4:1.

Byla provedena HRM analýza vzorků. Jelikož byla jednotlivá měření prováděna ve čtyřech opakováních, byl z těchto hodnot vypočten průměr. Průměrné teploty tání jsou uvedeny v Tabulce 12. Pro lepší přehlednost byl z naměřených hodnot sestaven graf (Obrázku 25).

Tabulka 12: Průměrné teploty tání oligonukleotidu p53con při působení proteinu p53 a BSA

Poměr protein:DNA	Oligonukleotid p53con	
	Teplota tání [°C]	
	p53	BSA
0:1	79,14 ± 0,26	79,36 ± 1,78
1:1	80,30 ± 0,11	79,56 ± 0,84
2:1	80,25 ± 0,24	79,55 ± 1,10
4:1	80,84 ± 0,06	79,47 ± 0,94



Obrázek 25: Grafické zpracování Tabulky 12. Znárodnuje závislost teploty tání oligonukleotidu p53con na koncentraci proteinu

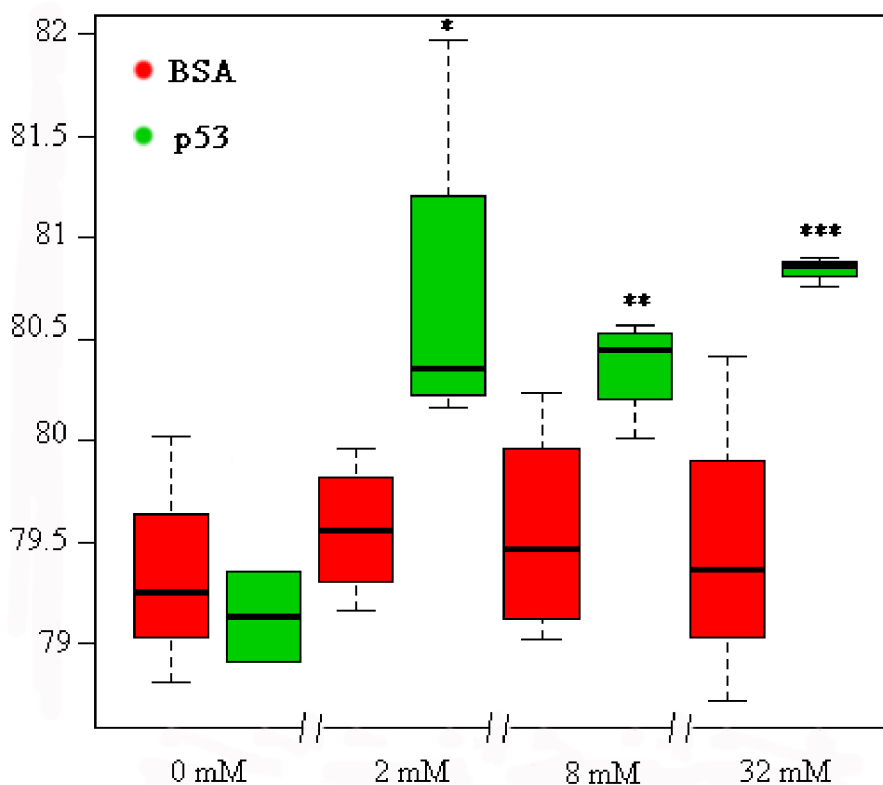
Na Obrázku 25 je znázorněna změna teploty tání v závislosti na měnícím se přidavku proteinu. I v tomto případě docházelo se zvyšujícím se poměrem proteinu, tedy i se zvyšující se koncentrací proteinu, ke zvyšování teploty tání. Teplota tání oligonukleotidu s proteinem p53 se zvýšila na teplotu 80,84 °C. Fakt, že se teplota tání zvyšovala, poukazuje na stabilizaci oligonukleotidu. Protein BSA sloužil jako negativní kontrola, s čímž se shoduje fakt, že nedocházelo k výraznějším změnám v teplotách tání, i přes to, že se navyšoval poměr

tohoto proteinu v roztoku.

Protein p53 se váže do velkého žlábků DNA, došlo ke stabilizaci mezimolekulové interakce a tím se pravděpodobně zvýšila teplota tání daného oligonukleotidu [26].

5.3.1 Statistické zpracování výsledků HRM analýzy s proteiny

Naměřené výsledky působení proteinu na oligonukleotid p53con byly statisticky zpracovány. Pro zpracování byl použit jednovýběrový studentův t-test (Obrázek 26). Pro statistické vyhodnocení byl jako nulový bod zvolen průměr teplot tání při koncentraci 0 mM – dohromady pro p53 i BSA.



Obrázek 26: Vliv vazby proteinů p53 a BSA na teplotu tání oligonukleotidu p53con, který obsahuje cílové místo pro protein p53 (p-value < 0.05 odpovídá *; p-value < 0.01 odpovídá **; p-value < 0.001 odpovídá ***).

Tabulka 13: Hladiny významnosti jednotlivých hodnot

Koncentrace proteinu	p-value pro p53	p-value pro BSA
0 mM	-	-
2 mM	0.04186	0.1832
8 mM	0.003027	0.3822
32 mM	0.0007043	0.6174

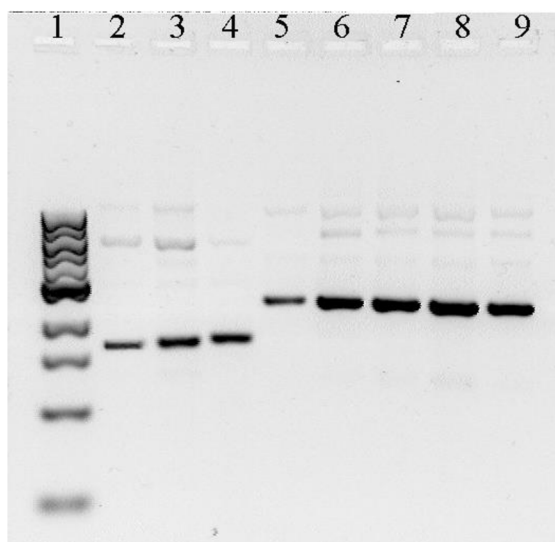
V Tabulka 13 jsou zobrazeny hodnoty významnosti. Čím vyšší jsou hodnoty v tabulce, tím má daná hodnota vyšší význam. Pokud jsou hodnoty vyšší než 0.1, pak u nich není výrazný statistický rozdíl. Pokud jsou hodnoty nižší než 0.05, jsou statisticky významně rozdílné. Z toho tedy vyplývá, že všechny rozdíly proteinu p53 oproti BSA jsou statisticky významné.

5.4 Izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla vyizolována dle postupu v kapitole 4.2.8 pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plasmid.

5.5 Agarósová gelová elektroforéza plasmidové DNA

Touto metodou byla ověřena přítomnost a intaktnost vyizolované plasmidové DNA. Postup je popsán v kapitole 4.2.10. Detekce byla provedena na transluminátoru. Ve všech vzorcích byla detekována izolovaná DNA, která byla relativně intaktní (Obrázek 27).



Obrázek 27: Gel z agarósově gelové elektroforézy plasmidové DNA. Start 1) hmotnostní standard 2) pBluescript 3) pPGM1 4) p3MYC 5) pGL4-10 6) pGL4-10-hifC 7) pGL4-10-hifG 8) pGL4-10-ILC 9) pGL4-10-ILG

5.6 Stanovení koncentrace a čistoty plasmidové DNA spektrofotometricky

Pomocí přístroje NanoDrop 2000 byla v rozmezí vlnových délek 230–320 nm měřena absorbance izolované DNA (kapitola 4.2.8). Absorbance byla u každého vzorku změřena třikrát a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Výsledky měření shrnuje Tabulka 14.

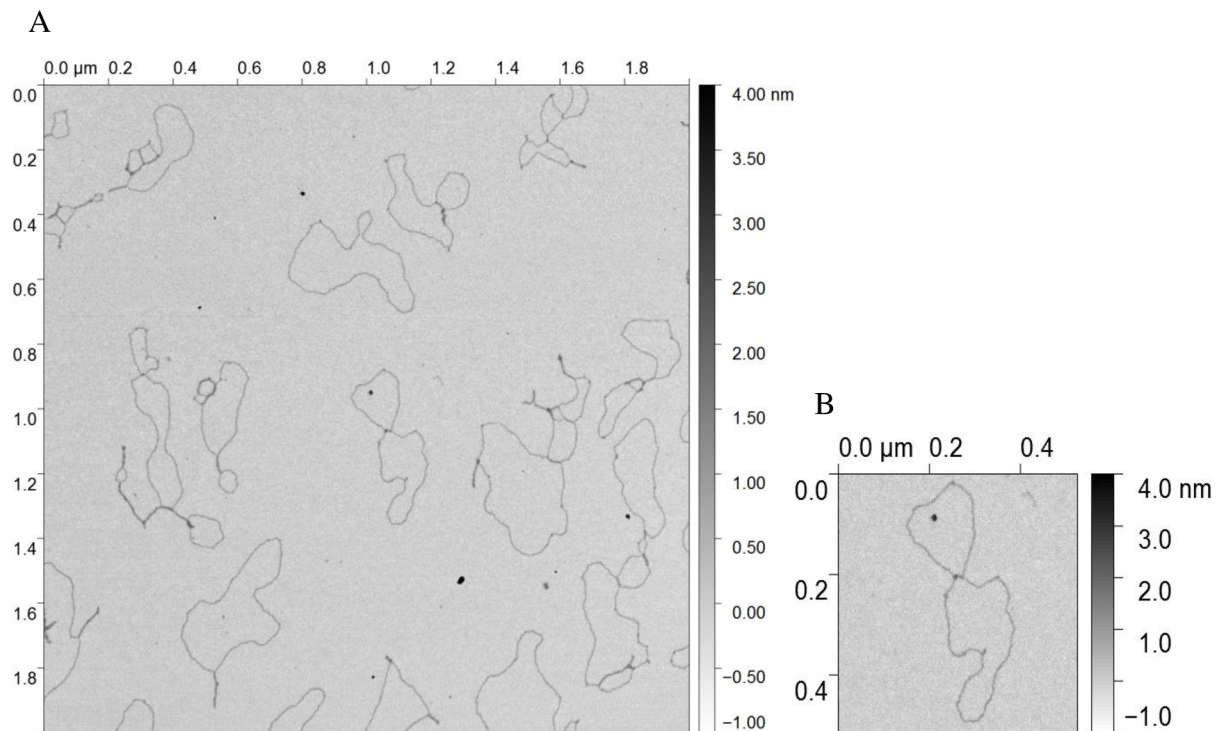
Tabulka 14: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Plasmid	Koncentrace [ng/ μ l]	Čistota (A_{260}/A_{280})
pBluescript	101,1	1,81
pPGM1	109,4	1,81
p3MYC	25,1	1,92
pGL4·10	33,1	1,84
pGL4·10-hifC	117,5	1,84
pGL4·10-hifG	129,6	1,82
pGL4·10-ILC	88,3	1,80
pGL4·10-ILG	164,7	1,86

Z poměru absorbance (A_{260}/A_{280}) se určuje čistota vzorku. Vzorek je považován za čistý, pokud jsou hodnoty v rozmezí od 1,8 do 2. Jak je vidět z Tabulka 14, hodnoty se pohybovaly v rozmezí 1,80–1,92 a lze je tedy považovat za čisté. Koncentrace naizolovaných plasmidů se pohybovaly v rozmezí 25,1–164,7 ng/ μ l. Nejnížší koncentraci měl vzorek p3MYC1, zatímco nejvyšší koncentraci měl vzorek pGL4·10-ILG. Důvodem velkého rozdílu koncentrací u jednotlivých plasmidů může být, že kolonie odebrány pro kultivaci a následnou izolaci nemusely být stejně velké, tedy počáteční množství buněk pro kultivaci bylo rozdílné. Dalším důvodem může být odlišná vitalita kultur a schopnost množit se v daném prostředí.

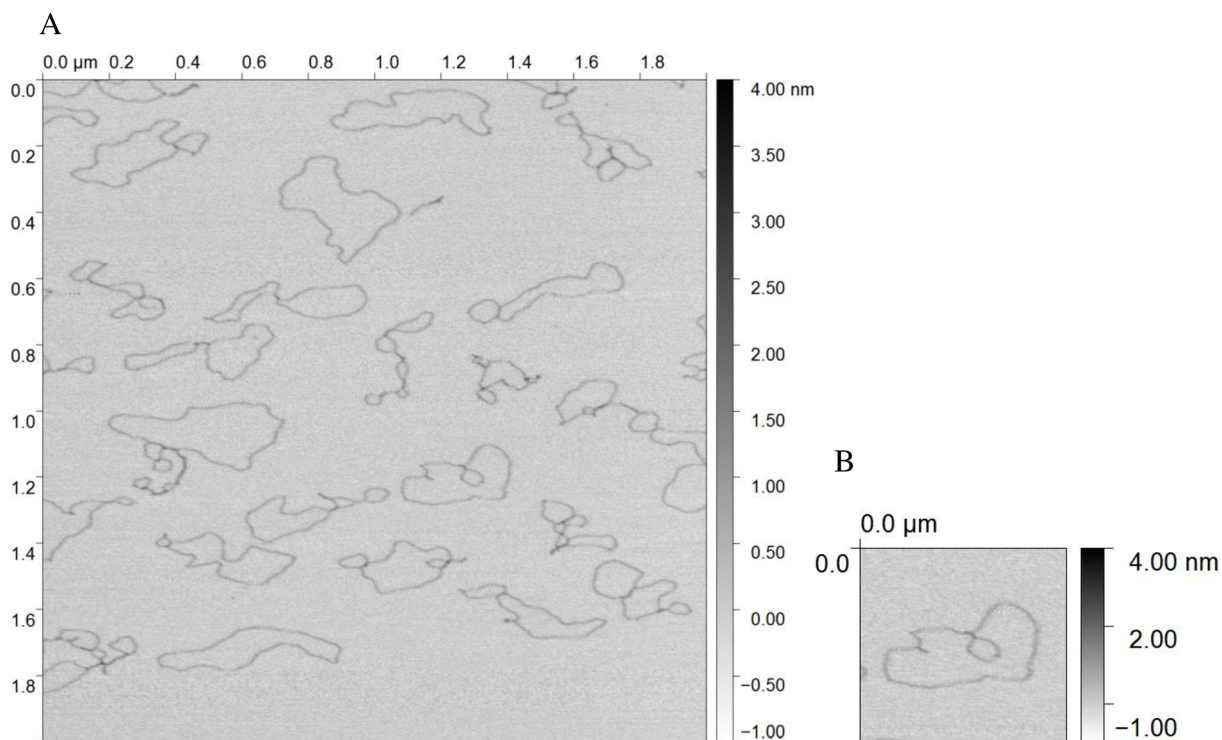
5.7 Sledování struktury plasmidů pomocí AFM

Při analýze byl využit AFM pufr, který netvoří na slídě pozadí. Vybrané plasmidy byly podrobeny AFM analýze (dle 4.2.12) a následně byly obrazové výstupy vyhodnoceny. Na Obrázku 28 lze vidět strukturu superhelikálního plasmidu pGL4·10. Je patrné, že docházelo k překřížení plasmidu a k tvorbě strukturních motivů. Na obrázku A je možno vidět několik překřížení, a také lokální struktury. Nejpravděpodobnější a nejčastěji jsou zastoupeny křížové struktury. Na obrázku můžeme dále vidět, že na pozadí vznikly nečistoty, ty ale neinteragují se vzorkem, a proto nejsou překážkou při sledování struktury DNA. Na obrázku B pak můžeme vidět detail jednoho plasmidu, kde je patrné jedno překřížení molekuly DNA, a malou extruzi DNA, která představuje křížovou strukturu.



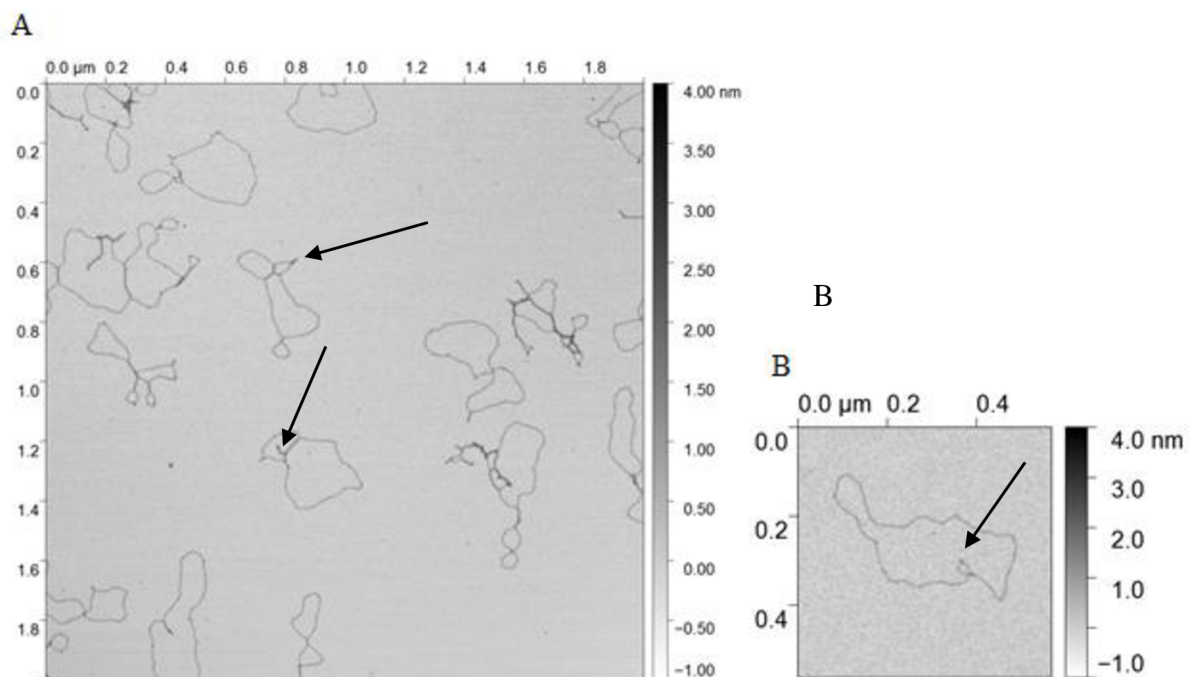
Obrázek 28: Plasmid pGL4-10 v AFM pufru v rozsahu 2 μm při rozlišení 1024 px. Na obrázku B vidíme zvětšený plasmid. Oblast skenování byla 0,5 μm při rozlišení 1024 px.

Plasmid pGL4-10-hifC obsahuje vloženou sekvenci bohatou na obsah cytosinu (C), která by měla vytvářet C-motiv. Jak je možné vidět na Obrázku 29, plasmid je superhelikální a dochází zde oproti plasmidu pGL4-10 ve větší míře ke křížení a tvorbě strukturních motivů. Na obrázku B pak je patrné překřížení, které utvořilo strukturní motiv, a zároveň je na obrázku B vidět vznik lokální struktury. U tohoto plasmidu se křížové struktury tvořily v menší míře, než tomu bylo u plasmidu pGL4-10. Naopak vznikalo více větších DNA struktur.



Obrázek 29: Plasmid pGL4-10-hifC v AFM pufru v rozsahu 2 μm při rozlišení 1024 px. Na obrázku B vidíme zvětšený plasmid. Oblast skenování byla 0,5 μm při rozlišení 1024 px.

I plasmid pGL4-10-ILC byl detekován jako nadšroubovicová DNA. Podobně jako plasmid pGL4-10-hifC obsahuje vloženou sekvenci bohatou na obsah cytosinu (C), která by měla tvořit kvadruplex nebo C-motiv. Jak je možné vidět na Obrázku 30, vzniklo zde velké množství překřížení a lokálních struktur. Dále je možno na výřezu obrázku vidět extruzi DNA, která je patrně tvořena větší inverzní repeticí, nebo právě C bohatou oblastí v plasmidové DNA (označeno šipkou). Další lokální struktury je možno vidět i na nezvětšeném obrázku A, které jsou také označeny šipkami. U plasmidu pGL4-10-ILC bylo detekováno nejvíce lokálních struktur z vybraných plasmidů.



Obrázek 30: Plasmid pGL4-10-ILCv AFM pufru v rozsahu 2 μm při rozlišení 1024 px. Na obrázku B vidíme zvětšený plasmid. Oblast skenování byla 0,5 μm při rozlišení 1024 px.

6 ZÁVĚR

V experimentální části bylo připraveno několik DNA pomocí hybridizace syntetických oligonukleotidů, které byly značeny fluorescenční značkou FAM. Pomocí elektroforézy PAGE bylo ověřeno, že vzniká požadovaná struktura. Následně byly pomocí HRM analýzy zjišťovány interakce mezi připravenými oligonukleotidy a jednomocnými, dvojmocnými ionty a proteiny. Měření byla zpracována i statisticky. Pomocí HRM analýzy byly zjištěny teploty tání oligonukleotidu, a poté se z této informace stanovilo, zda daná látka oligonukleotid stabilizuje, popřípadě destabilizuje.

Bylo prokázáno, že při účinku jednomocných iontů docházelo k postupnému navyšování teploty tání. Pro dvojmocné ionty Mg^{2+} a Ca^{2+} byla teplota tání markantně zvýšena již od první změny koncentrace. Při nejnižší testované koncentraci iontu došlo ke skokovému zvýšení teploty tání. S postupným navyšováním koncentrace už nedocházelo k dalším skokovým změnám, ale teplota se zvýšila pouze v rámci stupňů. Dvojmocné ionty Zn^{2+} dané oligonukleotidy pravděpodobně destabilizovaly, jelikož docházelo ke snižování teploty tání.

Při sledování účinku proteinů na oligonukleotid bylo zjištěno, že protein p53 stabilizuje testovaný oligonukleotid. V budoucnu by tyto výsledky měli být srovnány s dalšími lineárními DNA, s DNA bez p53 cílové sekvence a se strukturními motivy.

V další části práce byly izolovány vybrané plasmidy a pomocí AFM mikroskopu byla sledována struktura plasmidů a vznik křížových struktur.

CITACE

- [1] COX, Michael M., Jennifer A. DOUDNA a Michael O'DONNELL. *Molecular biology: principles and practice*. New York, NY: W.H. Freeman and Co., c2012. ISBN 07-167-7998-6
- [2] DAHM, Ralf. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics*. 2008, 122(6), 565-581 [cit. 2018-03-18]. ISSN 0340-6717.
- [3] BRDIČKA, Radim a William DIDDEN. *Genetika v klinické praxi*. Praha: Galén, 2016. ISBN 978-80-7492-107-0.
- [4] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. ISBN 80-7319-013-3
- [5] KOLEKTIV, Oldřich Nečas. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3., přeprac. vyd., V nakl. H. H, 2000. ISBN 80-860-2246-3
- [6] DICKERSON, R., H. DREW, B. CONNER, R. WING, A. FRATINI a M. KOPKA. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* [online]. 1982, **216**(4545), 475-485 [cit. 2018-03-18]. ISSN 0036-8075.
- [7] NUSSBAUM, Robert L., Roderick R. MCINNES a Huntington F. WILLARD. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton, c2004. ISBN 80-7254-475-6.
- [8] SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.
- [9] WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* [online]. 1953, **171**, 737–738 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1038/171737a0.
- [10] ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie: uchování a exprese genetické informace*. Praha: Medprint, 1997. Učební texty (Medprint). ISBN 80-902036-2-0.
- [11] ŽĎÁRSKÝ, Josef a Vladimír VÁŇA. *Biologie I*. 6., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1993. ISBN 80-7080-187-5
- [12] VOET, Donald. a Judith G. VOET. *Biochemistry*. 3rd ed. New York: J. Wiley, c2004. ISBN 9780471468585.
- [13] Obrázek: [online]. [cit: 2018-01-19]. Dostupné z: <https://www.popsci.com/ibms-watson-will-give-you-health-advice-based-your-dna>
- [14] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 4., (inovované) vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2005. ISBN 8090256252
- [15] JONES, Christopher P. a Adrian R. FERRÉ-D'AMARÉ. RNA quaternary structure and global symmetry. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2015, **40**(4), 211-220 [cit. 2018-04-11]. ISSN 09680004.
- [16] SIPSKI, M. Leonide a Thomas E. WAGNER. Probing DNA quaternary ordering with circular dichroism spectroscopy: Studies of equine sperm chromosomal fibers. *Biopolymers* [online]. 1977, **16**(3), 573-582 [cit. 2018-04-11]. ISSN 0006-3525.

- [17] KOVARIK, A., R. MATYASEK, K. Y. LIM, K. SKALICKÁ, B. KOUKALOVÁ, S. KNAPP, M. CHASE a A. R. LEITCH. Concerted evolution of 18-5.8-26S rDNA repeats in *Nicotiana allotetraploids*. *Biological Journal of the Linnean Society* [online]. 2004, **82**(4), 615-625 [cit. 2018-04-11]. ISSN 00244066.
- [18] G. WOLFGANG FUHS. *The Nuclear Structures of Protocaryotic Organisms (Bacteria and Cyanophyceae)*. Vienna: Springer Vienna, 1969. ISBN 3709155894.
- [19] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [20] RUMML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 8070804998.
- [21] DEMNEROVÁ, Kateřina. Kol. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-415-7.
- [22] Altting-Mees, M.A. and Short, J.M. 1989. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucl. Acids Res.* 17: 9494.
- [23] Obrázek: [online]. [cit: 2018-01-19]. Dostupné z: [http://www.transomic.com/Vectors-and-Maps/pBluescript-SK\(-\).aspx](http://www.transomic.com/Vectors-and-Maps/pBluescript-SK(-).aspx)
- [24] ANASTASSOPOULOU, Jane. Metal–DNA interactions. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2003, **651-653**, 19-26 [cit. 2018-04-05]. ISSN 00222860.
- [25] FOX, Ronald F. Structure and motion: Membranes, nucleic acids and proteins. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 1986, **11**(3), 119- [cit. 2018-04-05]. ISSN 09680004
- [26] PALCHAUDHURI, Rahul a Paul J HERGENROTHER. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2007, **18**(6), 497-503 [cit. 2018-04-05]. ISSN 09581669.
- [27] Obrázek: [online]. [cit: 2018-04-02]. Dostupné z: <http://www.threesology.org/bio-physiological-3s-2.php>
- [28] BANCROFT, Daniel P., Christopher A. LEPRE a Stephen J. LIPPARD. Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1990, **112**(19), 6860-6871 [cit. 2018-04-05]. ISSN 0002-7863.
- [29] KUBAŘ, Tomáš, Michal HANUS, Filip RYJÁČEK a Pavel HOBZA. Binding of Cationic and Neutral Phenanthridine Intercalators to a DNA Oligomer Is Controlled by Dispersion Energy: Quantum Chemical Calculations and Molecular Mechanics Simulations. *Chemistry -A European Journal* [online]. 2006, vol. **12**(1), pp.280-290 [cit. 2018-04-05]. ISSN 0947-6539.
- [30] DERVAN, Peter B. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2001, vol. 9, pp. 2215-2235. DOI: 10.1021/ja00474a075
- [31] RADIĆ STOJKOVIĆ, Marijana a Ivo PIANTANIDA. Tuning urea–phenanthridinium conjugates for DNA/RNA and base pair recognition. *Tetrahedron*. 2008, vol. **64**(33), pp.7807-7814 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.tet.2008.05.142
- [32] HENDRY, Lawrence B., Virendra B. MAHESH, Edwin D. BRANSOME a Douglas E. EWING. Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for

- normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 2007, **623**(1-2), 53-71 [cit. 2018-04-05]. ISSN 00275107.
- [33] REED, Gudrun H, Jana O KENT a Carl T WITWERT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*[online]. 2007, **8**(6), 597-608 [cit. 2018-02-21]. ISSN 1462-2416.
- [34] MARIN, M.S., S. QUINTANA, M.R. LEUNDA, M. RECAVARREN, I. PAGNUCO, E. SPÄTH, S. PÉREZ a A. ODEÓN. A new method for simultaneous detection and discrimination of Bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) using real time PCR with high resolution melting (HRM) analysis. *Journal of Virological Methods* [online]. 2016, **227**, 14-22 [cit. 2018-01-11]. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.10.005
- [35] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*[online]. 2014, **158**, 245-254 [cit. 2018-03-21]. ISSN 03088146.
- [36] M. TEVFIK DORAK (ED.). *Real-time PCR*. Repr. New York: Taylor & Francis, 2007. ISBN 041537734X
- [37] WOJDACZ, T. K. a A. DOBROVIC. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(6), e41-e41 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1093/nar/gkm013
- [38] ER, Tze-Kiong a Jan-Gowth CHANG. High-resolution melting: Applications in genetic disorders. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2012, **414**, 197-201 [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.1016/j.cca.2012.09.012. ISSN 00098981.
- [39] CHOU, Lan-Szu, Elaine LYON a Carl T. WITWERT. a Comparison of High-Resolution Melting Analysis With Denaturing High-Performance Liquid Chromatography for Mutation Scanning: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene as a Model. *American Journal of Clinical Pathology*[online]. 2005, **124**(3), 330-338 [cit. 2018-04-07]. ISSN 0002-9173
- [40] MONIS, Paul T., Steven GIGLIO a Christopher P. SAINT. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry* [online] [cit. 2018-01-18] ISSN 00032697.
- [41] REED, G. H. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry* [online]. 2004, **50**(10), 1748-1754 [cit. 2018-04-07]. ISSN 0009-9147.
- [42] WITWERT, T. C. et al. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49:6 853–860 (2003), [online] [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1373/49.6.853
- [43] Manuál CorPotocol 6000, High Resolution Melt Assay Design and Analysis. Corbett, 2006.
- [44] ŠIMENC, J. a U. POTOČNIK. Rapid differentiation of bacterial species by high

- resolution melting curve analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*[online]. 2011, **47**(3), 256-263 [cit. 2018-04-07]. ISSN 0003-6838.
- [45] HJELMSØ, Mathis Hjort, Lars Hestbjerg HANSEN, Jacob BÆLUM, Louise FELD, William E. HOLBEN, Carsten Suhr JACOBSEN a F. E. LÖFFLER. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, **80**(12), 3568-3575 [cit. 2018-04-07]. ISSN 0099-2240.
- [46] ZIPPER, H. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* [online]. 2004, **32**(12), e103-e103 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1093/nar/gnh101
- [47] Obrázek: [online]. [cit: 2018-01-19]. Dostupné z: <https://www.biovision.com/sybr-green-i-19630.html>
- [48] TERAJ, Takuya a Tetsuo NAGANO. Fluorescent probes for bioimaging applications. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2008, **12**(5), 515-521 [cit. 2018-03-24]. ISSN 13675931.
- [49] VALEUR, B. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. **205**(1), 3-40 [cit. 2018-03-24]. ISSN 00108545.
- [50] MIYAWAKI, Atsushi. Visualization of the Spatial and Temporal Dynamics of Intracellular Signaling. *Developmental Cell* [online]. 2003, **4**(3), 295-305 [cit. 2018-03-24]. ISSN 15345807
- [51] RIETDORF, Jens. a T. W. J. GADELLA. *Microscopy techniques*. New York: Springer, 2005. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 95. ISBN 9783540236986.
- [52] KUTYAVIN, I. V. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* [online]. **28**(2), 655-661 [cit. 2018-03-24]. ISSN 13624962.
- [53] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 0-387-31278-1.
- [54] Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., Brown, T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* (2000), vol. **28**: pp. 3752-3761.
- [55] TYAGI, Sanjay a Fred Russell KRAMER. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* [online]. 1996, **14**(3), 303-308 [cit. 2018-03-30]. ISSN 1087-0156.
- [56] Huygens, F., Inman-Bamber, J., Nimmo-G.R., Munckhof, W., Schooneveldt, J., Harrison, B., McMahon, J.A., Giffard, P.M. Staphylococcus aureus Genotyping Using Novel Real-Time PCR Formats. *J. Clin. Microbiol.* (2006), **44**: 3712-3718.
- [57] Obrázek: [online]. [cit: 2018-01-19]. Dostupné z: <http://www.biosyn.com/oligonucleotideproduct/6-fam-dt-fluorescent-dye-oligonucleotide-labeling.aspx>
- [58] MULLAH, Bashar a Alex ANDRUS. Automated synthesis of double dye-labeled

- oligonucleotides using tetramethylrhodamine (TAMRA) solid supports. *Tetrahedron Letters* [online]. 1997, **38**(33), 5751-5754 [cit. 2018-04-09]. ISSN 00404039.
- [59] FÖRSTER, Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* [online]. 1948, **437**(1-2), 55-75 [cit. 2018-03-30]. ISSN 00033804.
- [60] PARKHURST, Kay M. a Lawrence J. PARKHURST. Donor-Acceptor Distance Distributions in a Double-Labeled Fluorescent Oligonucleotide Both as a Single Strand and in Duplexes. *Biochemistry* [online]. 1995, **34**(1), 293-300 [cit. 2018-03-30]. ISSN 0006-2960.
- [61] Didenko V. V. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications, Biotechniques, (2001) 31, 5, 1106-1121
- [62] KALTENBOECK, Bernhard a Chengming WANG. *Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics* [online]. Elsevier, 2005, 2005, s. 219-259 [cit. 2018-04-03]. Advances in Clinical Chemistry. ISBN 9780120103409
- [63] CONNOLLY, Geoffrey R a Bharat K C PATEL. Development of fluorescent adjacent hybridization probes and their application in real-time PCR for the simultaneous detection and identification of *Fervidobacterium* and *Caloramator*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*[online]. 2002, **52**(5), 1837-1843 [cit. 2018-04-03]. ISSN 1466-5026.
- [64] Obrázek: [online]. [cit: 2018-01-19]. Dostupné z: <http://dyes.gene-quantification.info/>
- [65] CARDULLO R.A., AGRAWAL S., FLORES C., ZAMECNIK P.C., WOLF D.E. Detection of nucleic acid hybridization by non-radiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1988, Vol. 85, p. 8790.
- [66] NAGY, Alexander, Lenka ČERNÍKOVÁ, Eliška VITÁSKOVÁ, et al. MeltMan: Optimization, Evaluation, and Universal Application of a qPCR System Integrating the TaqMan qPCR and Melting Analysis into a Single Assay. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(3), e0151204- [cit. 2018-04-04]. ISSN 1932-6203.
- [67] Pamela M. Holland, Richard D. Abramson, Robert Watson and David H. Gelfand. Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5' → 3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991., 88(16), 7276-7280.
- [68] Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21: 3761–3766.
- [69] TYAGI, Sanjay a Fred Russell KRAMER. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* [online]. 1996, **14**(3), 303-308 [cit. 2018-04-04]. ISSN 1087-0156.
- [70] TYAGI, Sanjay, Diana P. BRATU a Fred Russell KRAMER. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology* [online]. 1998, **16**(1), 49-53 [cit. 2018-04-04]. ISSN 1087-0156.
- [71] Obrázek: [online]. [cit: 2018-01-19]. Dostupné z: <https://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>
- [72] Wu RM, Wood M, Thrush A, Walton EF, Varkonyi-Gasic E. Real-time PCR quantification of plant miRNAs using universal probe library technology. *Biochemica*.

- 2007;202(2):12–15
- [73] KAUR, Harleen, Amit ARORA, Jesper WENGEL a Souvik MAITI. Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes †. *Biochemistry* [online]. 2006, **45**(23), 7347-7355 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1021/bi060307w. ISSN 0006-2960.
- [74] SANTOS, Nuno C. a Miguel A.R.B. CASTANHO. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophysical Chemistry* [online]. 2004, **107**(2), 133-149 [cit. 2018-04-07]. ISSN 03014622.
- [75] WICKRAMASINGHE, H.K. Progress in scanning probe microscopy. *Acta Materialia* [online]. 2000, **48**(1), 347-358 [cit. 2018-04-07]. ISSN 13596454.
- [76] KUBÍNEK, Roman, Milan VŮJTEK a Miroslav MAŠLÁŇ. *Mikroskopie skenující sondou*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. ISBN 80-244-0602-0.
- [77] RICHARD BOWEN, W. Atomic force microscope studies of membranes: Surface pore structures of Cyclopore and Anopore membranes. *Journal of Membrane Science* [online]. 1996, **110**(2), 233-238 [cit. 2018-04-07]. ISSN 03767388.
- [78] L. Machala, M. Vůjtek, R. Kubínek a M. Mašláň, *Mikroskopie skenující sondou*, (2003) Univerzita Palackého Olomouc.
- [79] BOOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHAM. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies, 2000.
- [80] FRANK, Luděk a Jaroslav KRÁL, ed. *Metody analýzy povrchů: iontové, sondové a speciální metody*. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0594-3.
- [81] ADYA, Ashok K., Elisabetta CANETTA a Graeme M. WALKER. Atomic force microscopic study of the influence of physical stresses on *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research* [online]. 2006, **6**(1), 120-128 [cit. 2018-04-07]. ISSN 15671356.
- [82] K. Tománková, H. Kolářová, R. Kubínek, M. Vůjtek a H. Dušková, *Mikroskopie atomárních sil v biologických aplikacích*, Čs. čas. fyz. 56 (2006).
- [83] CHANG, Kai-Chih, Yu-Wei CHIANG, Chin-Hao YANG a Je-Wen LIOU. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal* [online]. 2012, **24**(4), 162-169 [cit. 2018-04-07]. ISSN 10163190.
- [84] VANSTEENKISTE, S.O., M.C. DAVIES, C.J. ROBERTS, S.J.B. TENDLER a P.M. WILLIAMS. Scanning probe microscopy of biomedical interfaces. *Progress in Surface Science* [online]. 1998, **57**(2), 95-136 [cit. 2018-04-08]. ISSN 00796816.
- [85] [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: http://atmilab.upol.cz/texty/dipl_bio.pdf
- [86] WICKRAMASINGHE, H.K. Progress in scanning probe microscopy. *Acta Materialia* [online]. 2000, **48**(1), 347-358 [cit. 2018-04-08]. ISSN 13596454.
- [87] L. Machala, M. Vůjtek, R. Kubínek a M. Mašláň, *Mikroskopie skenující sondou*, (2003) Univerzita Palackého Olomouc
- [88] VEERAPANDIAN, Murugan a Kyusik YUN. Study of Atomic Force Microscopy in Pharmaceutical and Biopharmaceutical Interactions - a Mini Review. *Current Pharmaceutical Analysis* [online]. 2009, **5**(3), 256-268 [cit. 2018-04-08]. ISSN 15734129

- [89] HILAL, N., W.R. BOWEN, L. ALKHATIB a O. OGUNBIYI. a Review of Atomic Force Microscopy Applied to Cell Interactions with Membranes. *Chemical Engineering Research and Design* [online]. 2006, **84**(4), 282-292 [cit. 2018-04-08]. ISSN 02638762.
- [90] ISRAELACHVILI, Jacob N. *Intermolecular and surface forces*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 978-0-12-375182-9.
- [91] ALONSO, José Luis a Wolfgang H GOLDMANN. Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sciences* [online]. 2003, **72**(23), 2553-2560 [cit. 2018-04-09]. ISSN 00243205.
- [92] Obrázek: [online]. [cit: 2018-04-07]. Dostupné z: https://www.brukerafmprobes.com/download/BrukerProbeCat_2013_International_LowFinal.pdf
- [93] ANASTASSOPOULOU, Jane. Metal–DNA interactions. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2003, **651-653**, 19-26 [cit. 2018-05-03]. ISSN 00222860.

SEZNAM ZKRATEK

AE	eluční pufr
AFM	mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy)
APS	ammonium peroxodisulfát
BB	binding buffer (pufr používány pro vazbu proteinu na DNA)
bp	páry bází
BSA	hovězí sérový albumin
C	cytosin
ccc	kovalentní uzavřená kružnice (covalently closed circular)
DAPI	4',6-diamino-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAM	6-karboxyfluorescein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HRM	High resolution melting (vysokorozlišovací analýza křivek tání)
LNA	uzavřená nukleová kyselina (Locked Nucleic Acids)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RNA	ribonukleová kyselina
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SPM	mikroskopie skenovací sondou (Scanning Probe Microscopy)
TAE	tris-báze, acetát a kyselina ethylendiaminotetraoctová
TBE	tris, borát, kyselina ethylendiaminotetraoctová
TE	tris-EDTA
TEMED	tetramethylethylen diamin
TET	6-karboxy 4,7,20,70 tetrachlorofluorescein
T _m	teplota tání
Wt	wild type (standardní varianta proteinu)