

Stanovení DNA fluorimetricky

Lenka Böhmová

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka BÖHMOVÁ**
Osobní číslo: **T08605**
Studijní program: **B 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Stanovení DNA fluorimetricky**

Zásady pro vypracování:

1. Zavést a optimalizovat metodiku fluorimetrického stanovení DNA.
2. Aplikovat metodiku na stanovení koncentrace DNA v PCR produktech.
3. Pokusit se korelovat výsledky s dalšími dostupnými údaji.
4. Provést literární rešerši a zpracovat výsledky experimentů do formy BP.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

14. února 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

27. května 2011

Ve Zlíně dne 14. února 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
ředitel ústavu



Příjmení a jméno:

Obor:

P R O H L Á Š E N Í

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřuje na ověření použitelnosti fluorimetrického stanovení DNA v praxi. Práce se soustřeďuje na upřesnění podmínek stanovení DNA touto metodou. Jejím výsledkem je návod na provedení stanovení obsahu DNA ve vzorku fluorimetrickou metodou.

Klíčová slova: DNA, fluorimetrie, barvivo Hoechst 33258

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the verification of the applicability of fluorimetric DNA determination in practise. This thesis focuses on the specification of the conditions of determining DNA by this method. The result of the thesis is an instruction of realization of the DNA determination in the sample, using the fluorimetric method.

Keywords: DNA, fluorimetry, color Hoechst 33258,

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, panu doc. Mgr. Markovi Koutnému Ph.D za jeho trpělivost při konzultacích, odborné vedení a pomoc.

OBSAH

ÚVOD	6
I TEORETICKÁ ČÁST	7
1 FLUORESCENCE A JEJÍ ANALYTICKÉ VYUŽITÍ.....	8
1.1 FLUORIMETRIE	8
1.2 PRINCIP FLUORIMETRICKÉHO STANOVENÍ DNA	9
1.2.1 Bisbenzimidin H 33258	9
1.2.2 Zvažující faktory pro stanovení	10
II PRAKTICKÁ ČÁST	12
2 MATERIÁL A METODY	13
2.1 POUŽITÝ MATERIÁL	13
2.1.1 DNA Quantification Kit	13
2.1.1.1 Pufr	13
2.1.1.2 Barviva	13
2.1.1.3 Kalibrační roztok DNA (standard).....	13
2.1.2 Příklad	14
2.2 METODY	14
2.2.1 UV/VIS spektrometrie.....	14
2.2.1.1 Vzorec pro výpočet koncentrace DNA ve vzorku	14
2.2.1.2 Vzorec pro výpočet obsahu DNA	14
2.2.1.3 Vzorec pro výpočet čistoty DNA	15
2.2.2 Fluorescenční spektroskopie	15
2.2.2.1 Příprava roztoků	15
2.2.2.2 Měření.....	15
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	16
3.1 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST	16
3.2 STANOVENÍ KONCENTRACE DNA V PRODUKTU PCR REAKCE	18
3.2.1 Při použití GoTaq Green Hot Start Mastermix	18
3.2.1.1 Vzorek č.10	19
3.2.2 Při použití GoTaq Colorless Hot Start Mastermix	21
3.2.2.1 Vzorek č.14	21
3.2.2.2 Vzorek č.17	23
3.2.2.3 Vzorek č.36	26
3.2.3 Porovnání metody s UV stanovením DNA	28
ZÁVĚR	30
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	31
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	33
SEZNAM OBRÁZKŮ	34
SEZNAM TABULEK	35
SEZNAM PŘÍLOH	36

ÚVOD

Kvantifikace DNA je důležitým krokem pro značnou část praktické molekulární biologie. Koncentrace nukleových kyselin lze stanovit několika různými metodami.

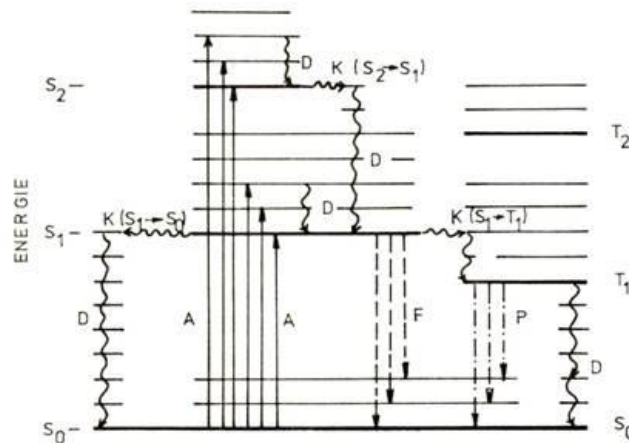
První z možných metod je stanovení pomocí měření absorbance v UV oblasti při 260 nm. Dalšími metodami jsou semikvantitativní stanovení elektroforézou v agarózovém gelu vizualizací pomocí fluorescenčního barviva, možná, ale málo používaná, je metoda založená na bioluminiscenci. Poměrně časté je, v této práci rozebírané, fluorimetrické stanovení.

Z praktického hlediska je potřeba co nejvíce snížit objem vzorku potřebný pro stanovení, aby se s malým množstvím vzorku DNA, které je k dispozici, dalo provést několik operací. Problémem u jiných metod, například často používané spektrofotometrické metody, může být silné rušení ostatními přítomnými látkami, což vede k omezení citlivosti těchto metod.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FLUORESCENCE A JEJÍ ANALYTICKÉ VYUŽITÍ

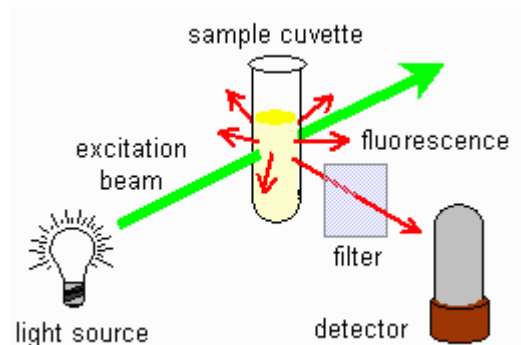
Absorpce záření vede k excitaci molekuly ze základní elektronové hladiny na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém stavu excitovaném. Obvykle jde o první excitovaný singletový stav. Molekula na vysoké vibrační hladině, při kolizích s okolními molekulami, ztrácí rychle energii a přechází na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu (Obr.1). O fluorescenci mluvíme, nastane-li přechod na základní elektronovou hladinu ze singletového excitovaného stavu vyzářením nadbytečné energie emisí fotonu. Jedná se o zářivý přechod do základního energetického stavu. [1]



Obr. 1: Zobecněný Jablonského diagram, A - absorpce elektromagnetického záření, F - fluorescence, P - fosforescence, D - nezářivé přechody, S_0 - základní singletový stav, S_1 , S_2 - excitované singletové stavy, T_1 , T_2 - excitované tripletové stavy [2]

1.1 Fluorimetrie

Fluorimetrie je velmi citlivou a jednoduchou metodou, použitelnou například právě pro kvantifikaci DNA. Jednoduchý fluorimetr se skládá ze zdroje světla vhodné vlnové délky, které dopadá na kyvetu se vzorkem. Emitované záření je detekováno



Obr. 2: Schéma fluorimetru [3]

zpravidla v kolmém směru k záření excitačnímu. Intenzita emitovaného světla je přímo úměrná koncentraci fluoreskující látky ve vzorku. Tato jednoduchá závislost ovšem platí pouze pro nízké koncentrace analytu. [4]

$$I_f = K \cdot I_0 \cdot C$$

kde: I_f – intenzita emitovaného záření

I_0 – intenzita záření dopadajícího na vzorek

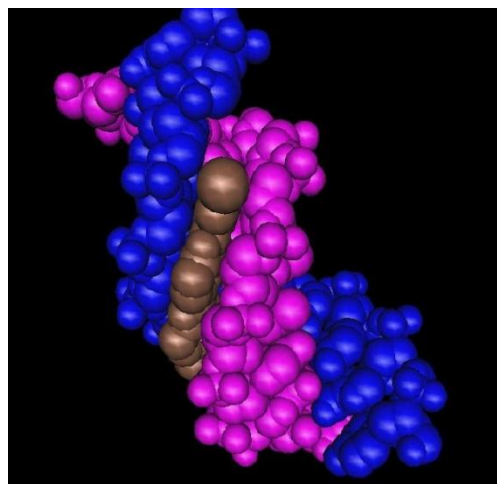
K – konstanta

C – koncentrace analytu [mol/l]

Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce budícího záření. [5]

1.2 Princip fluorimetrického stanovení DNA

Fluorescenční barvivo používané k tomuto stanovení, bisbenzimidin H 33258, svou vazbou především k AT sekvencím dvouřetězcové DNA, ztrácí částečně možnost předání své energie získané excitací, kolizí s okolními molekulami v roztoku, což se projeví zvýšenou fluorescencí. Pomocí tohoto barviva lze stanovit nanogramová množství DNA v mililitru vzorku. [4]

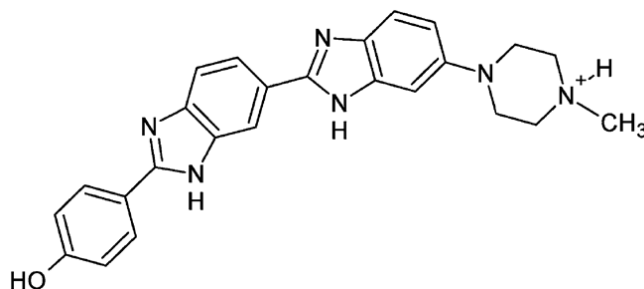


Obr. 3: Vazba barviva H 33258 na DNA [6]

1.2.1 Bisbenzimidin H 33258

Toto barvivo dobře funguje s purifikovanými preparáty DNA stejně jako se surovými extrakty DNA, které mohou být kontaminovány RNA a proteiny. K excitaci elektronů dochází při vlnové délce 360 nm a fluorescence probíhá při 460 nm.

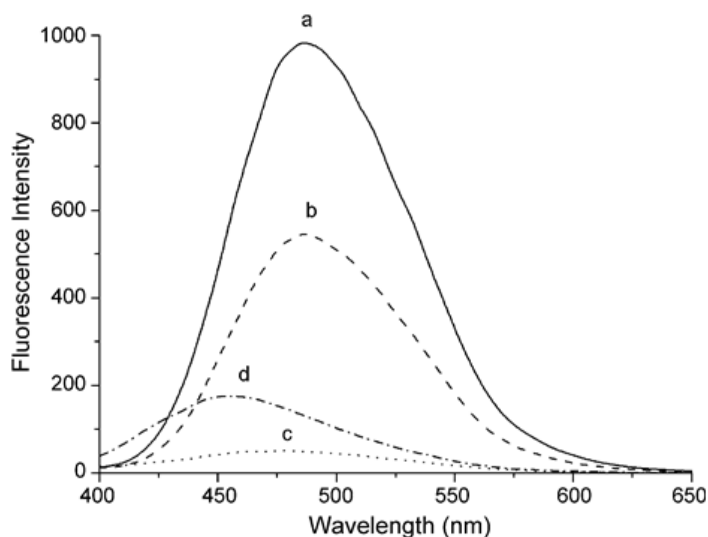
Lineární a cyklická dvouřetězcová DNA bude vykazovat obdobnou hodnotu fluorescence, ale vazba barviva na jednořetězcovou DNA je slabší než vazba tohoto barviva na DNA dvouřetězcovou. RNA může taktéž zvyšovat hodnotu fluorescence, ale v mnohem menší míře než DNA.



Obr. 4: Vzorec barviva H 33258 [7]

Minimální požadovaná délka DNA pro stanovení, je závislá na sekvenci DNA, protože jak již bylo řečeno, toto barvivo tvoří komplex převážně s AT sekvencemi DNA. Test s bisbenzimidinem není vhodný pro použití u jednořetězcových oligomerů.

Svou schopností, vázat se na AT sekvence molekul DNA, se řadí mezi látky podezřelé z karcinogenity a mutagenity, proto je třeba při práci s ním používat ochranné pomůcky, především ochranné rukavice. Při stanovení však pracujeme s velmi nízkými koncentracemi tohoto barviva. [4]



Obr. 5: Fluorescenční emisní spektrum (a) čistého barviva H 33258 při pH 4,5, (b) barviva s DNA při pH 4,5, (c) čistého barviva při pH 7,4 a (d) barviva s přidanou DNA při pH 7,4. [8]

1.2.2 Zvažující faktory pro stanovení

Typ DNA ve vzorku ovlivňuje fluorescenci barviva H 33258, proto je důležité používat podobné standardy DNA. DNA separovaná z telecího

brzlíku často slouží jako referenční pro většinu rostlinných a živočišných DNA, protože je dvouřetězcová a obsahuje 58% AT sekvencí. Pro bakteriální DNA mohou být potřebné jiné standardy, protože obsah AT sekvencí se velmi liší v závislosti na druhu. Fluorescence je zeslabena v přítomnosti vysokých koncentrací solí.

Konformace plasmidové DNA může vést k rozdílům v účinnosti vazby barviva. Z toho důvodu je důležité vybrat standard s podobnými vlastnostmi, jako má měřený vzorek.

Použité barvivo H 33258 fluoreskuje přibližně o polovinu méně, jestliže je ve vzorku jednořetězcová genomická DNA, než když měříme dvouřetězcovou genomickou DNA. Navíc, krátké části jednořetězcové DNA nevykazují za normálních okolností fluorescenci, vzhledem k jejich koncentraci.

Pufry, běžně používané k extrakci DNA z buňky, a nízké koncentrace detergentů mají malý, nebo žádný efekt na prováděný test.

Koncentrace soli ve vzorku nemá, až do koncentrace 3M NaCl, žádný efekt na prováděný test. Maximální zvýšení fluorescence při vazbě na DNA je dosaženo při vhodné koncentraci soli např. 200 mM NaCl pro purifikovanou DNA, od 2M do 3M pro surovou DNA. V surové DNA způsobuje vyšší koncentrace disociaci proteinů od DNA, umožňující molekule barviva vázat se na DNA.

RNA významně nezasahuje do testu DNA, protože použité barvivo nemá obvykle na RNA vazbu. Při vyšší koncentraci solí, je fluorescence způsobená RNA obvykle menší než 1% ze signálu vyprodukovaného stejnou koncentrací DNA. [9]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Použitý materiál

2.1.1 DNA Quantification Kit

Tento komerčně vyráběný kit obsahuje:

2.1.1.1 Pufř

Zásobní roztok pufř (10x TNE): Pufř je uchováván při -80°C . Skládá se z tris(hydroxymethyl)aminometanu, EDTA, disodné soli, chloridu sodného a kyseliny chlorovodíkové.[9]

Roztok pufř (1x TNE): 1 ml pufř 10x TNE se smíchá s 9 ml vody pro molekulární biologii. Získá se 10 ml roztoku pufř 1x TNE. [9]

2.1.1.2 Barviva

Základní roztok barviva (B): Barvivo (bisBenzimidine H 33258) o $c = 10 \text{ mg/ml}$ je součástí kitu a je uchováváno při -80°C .

Zásobní roztok barviva (1B): 10 μl základního roztoku barviva B ($c = 10 \text{ mg/ml}$) se smíchá s 990 μl vody pro molekulární biologii. Získá se 1 ml zásobního roztoku barviva (1B) o koncentraci $c = 0,1 \text{ mg/ml}$. Zásobní roztok je citlivý na světlo a je proto nutno jej uchovávat ve tmě a při 5°C .

Pracovní roztok barviva (2B): 10 μl barviva 1B ($c = 0,1 \text{ mg/ml}$) se smíchá s 4,99 ml pufř 1x TNE. Získá se 5 ml zásobního roztoku barviva (2B) o $c = 0,2 \text{ mg/ml}$. Pracovní roztok barviva je nutné připravovat vždy čerstvě před vlastním stanovením. [9]

2.1.1.3 Kalibrační roztok DNA (standard)

Základní roztok DNA: DNA o koncentraci 1 mg/ml je součástí kitu a je uchováván při -80°C .

Zásobní roztok DNA: 10 μl základního roztoku DNA se smíchá se 100 μl 10x TNE pufř a 890 μl vody pro molekulární biologii. Získá se 1 ml zásobního roztoku o $c = 10 \mu\text{g/ml}$. Připravený zásobní roztok DNA je uchováván při 5°C . [9]

2.1.2 Příklad

Na změření hodnoty fluorescence jsme použili Luminometr s UV fluorescenčním modulem 20/20ⁿ od firmy Turner Biosystems (USA). Excitační vlnová délka fluorescenčního modulu byla 365 nm a k emisi záření docházelo v tomto modulu při 440-470 nm.[10]



Obr. 6: Luminometr 20/20ⁿ s UV fluorescenčním modulem [10]

2.2 Metody

2.2.1 UV/VIS spektrometrie

Je doposud nejvíce používanou metodou pro stanovení obsahu DNA a jeho čistoty. Využívá absorpce světla v DNA. Měření se provádí při vlnové délce 260 nm. Jednotková hodnota absorbance při této vlnové délce odpovídá 50 µg/ml čisté DNA. [11]

2.2.1.1 Vzorec pro výpočet koncentrace DNA ve vzorku

$$c_{DNA} (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} - A_{320}) \cdot f \cdot 50 \mu\text{g/ml},$$

kde c_{DNA} - koncentrace DNA [µg/ml]

A_{260} – absorbance při 260 nm, odpovídá obsahu DNA

A_{320} – absorbance při 320 nm, oprava na zákal roztoku

f - faktor zředění vzorku

2.2.1.2 Vzorec pro výpočet obsahu DNA

$$m_{DNA} = c_{DNA} \cdot V_{celk.}$$

kde m_{DNA} - hmotnost DNA [µg]

$V_{celk.}$ – celkový objem vzorku [ml]

2.2.1.3 Vzorec pro výpočet čistoty DNA

Jestliže je výsledek tohoto výpočtu v rozmezí od 1,7 do 2,0, pak se jedná o vysoce kvalitní vzorek DNA.

$$P_{DNA} = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320}),$$

kde P_{DNA} - čistota DNA

A_{280} - hodnota absorbance naměřená při 280 nm kde se projevují kontaminující látky

2.2.2 Fluorescenční spektroskopie

2.2.2.1 Příprava roztoků

Jak kalibrační roztoky, tak roztoky vzorků byli připraveny v objemech 250 μ l. Pro kalibrační roztoky byl použit zásobní roztok DNA o koncentraci 10 μ g/ml smíchaný s pufrům 10x TNE a s vodou pro molekulární biologii, viz. Tab. 1.

Roztoky vzorků s neznámým obsahem DNA byly připraveny smícháním 2 μ l vzorku s 25 μ l pufru 10x TNE a doplněny vodou pro molekulární biologii do již zmiňovaného objemu 250 μ l a následně smíchány s barvivem 2B stejně jako roztoky pro kalibraci.

2.2.2.2 Měření

Pro samotné měření bylo 100 μ l každého ze vzorků smícháno s barvivem 2B v poměru 1:1 a poté byla směs důkladně promíchána. Poté bylo odebráno 150 μ l připravené směsi do mikrokvet a ponecháno 2-5 minut k inkubaci. Následovalo měření na přístroji. Koncentrace DNA byla následně vypočtena z rovnice kalibrační křivky. Všechny vzorky byly stanoveny 3x vedle sebe.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

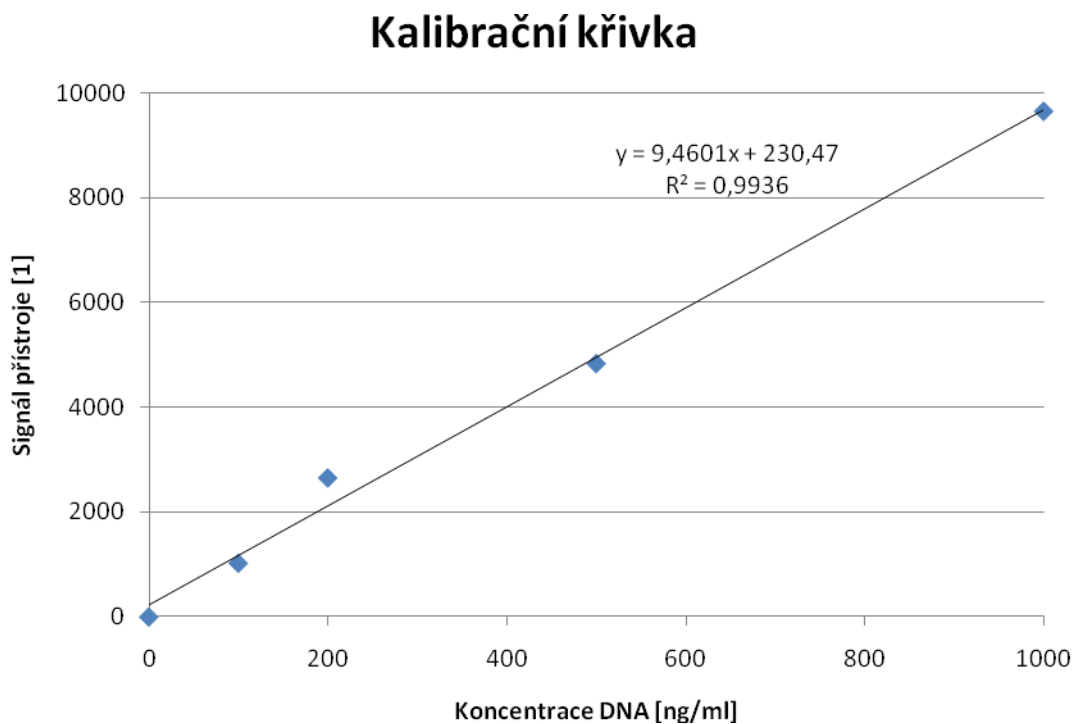
Cílem naší práce bylo zavést a adaptovat metodu fluorescenčního stanovení DNA. Hlavním typem vzorku pro nás byli PCR směsi obsahující velké množství kontaminujících látek, což brání v použití UV/VIS metody pro stanovení obsahu DNA. Dalším cílem naší práce bylo minimalizovat množství vzorku potřebného pro stanovení.

3.1 Kalibrační závislost

Prvním krokem pro zavedení naší metody bylo měření standardních vzorků, konstrukce kalibrační křivky a ověření funkčnosti metody na těchto standardech. Nejprve jsme se pokusili naměřit kalibrační závislost v rozsahu koncentrací 100-2000 ng/ml.

Tab. 1: Pipetované objemy pro kalibraci (μl)

Koncentrace kalibračních roztoků DNA [ng/ml]	0	100	200	500	1000	2000
Objem standardu DNA o $c=10 \mu\text{g/ml}$ [μl]	0	2,5	5	12,5	25	50
Objem pufru 10x TNE [μl]	25	25	25	25	25	25
Objem vody pro molekulární biologii [μl]	225	222,5	220	212,5	200	175
Celkový objem [μl]	250	250	250	250	250	250



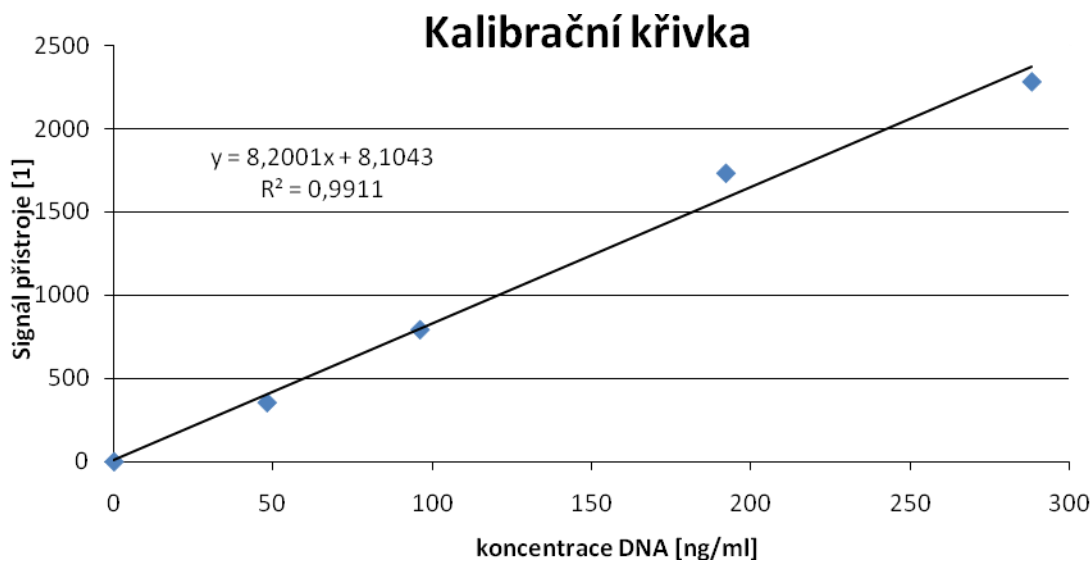
Obr. 7: Kalibrační graf pro stanovení koncentrace DNA

Výsledná kalibrační závislost je uspokojivá, příslušný regresní koeficient vyšel 0,9936.

Rozsah kalibrační křivky a koncentrace použitého standardu byla upravována vzhledem k předpokládanému obsahu DNA v neznámých vzorcích. Rozmezí koncentrací kalibračních standardů jsme zúžili na 48 až 288 ng/ml.

Tab. 2: Pipetované objemy v případě užšího rozsahu koncentrací (μl)

Koncentrace kalibračních roztoků DNA [ng/ml]	0	48	96	192	288
Objem standardu DNA o $c=10 \mu\text{g/ml}$ [μl]	0	6	12	24	36
Objem pufru 10x TNE [μl]	25	25	25	25	25
Objem vody pro molekulární biologii [μl]	225	219	213	201	189
Celkový objem [μl]	250	250	250	250	250



Obr. 8: Kalibrační závislost pro stanovení DNA se zúženým rozsahem koncentrací standardů

Kalibrační závislost byla v případě zúženého rozsahu koncentrací taktéž uspokojivá. Můžeme říci, že pro většinu námi měřených vzorků, je užší rozsah kalibrační křivky vhodnější, vzhledem k nízkým koncentracím DNA v daných vzorcích.

3.2 Stanovení koncentrace DNA v produktu PCR reakce

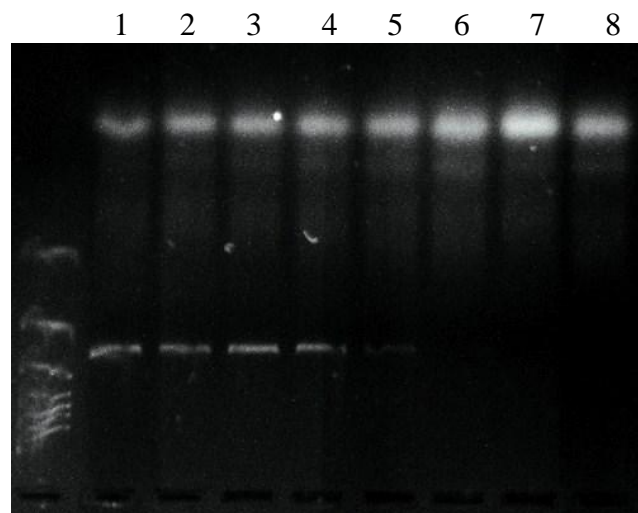
Jako vzorky pro naše stanovení jsme používali produkty PCR reakce. Objem vzorku použitý k našemu stanovení byl 2 μ l.

3.2.1 Při použití GoTaq Green Hot Start Mastermix

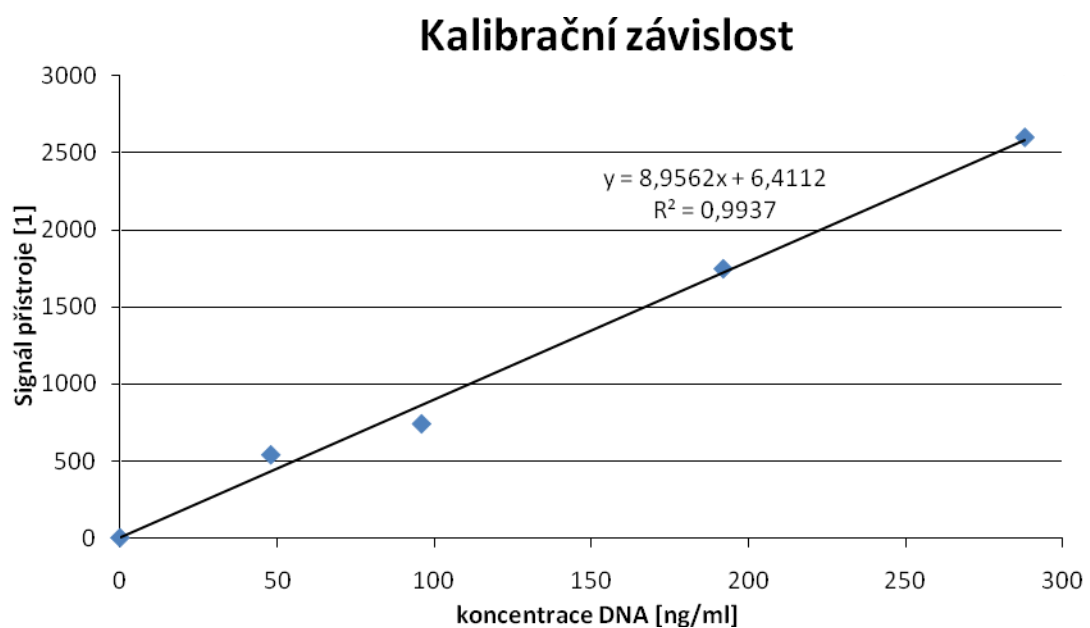
Jako první typ vzorků jsme používali produkty PCR reakce se zeleným barvivem GoTaq Green Hot Start Mastermix. Vzhledem k velkému zředění měřených vzorků jsme předpokládali, že přítomné barvivo nebude mít vliv na naši metodu stanovení, i když obecně může být přítomnost absorbující molekuly ve vzorku problémem, protože může docházet ke zhášení fluorescence.

3.2.1.1 Vzorek č.10

Jedním z námi měřených vzorků obsahující barvivo GoTaq Green Hot Start Mastermix byl produkt PCR reakce označen jako vzorek č.10.



Obr. 9: Fotka PCR produktu pro vzorek č.10



Obr. 10: Kalibrační závislost změřená před stanovením obsahu DNA ve vzorku č.10

Na základě hodnoty regresního koeficientu 0,9937 této kalibrační křivky, můžeme říci, že námi naměřené hodnoty kalibračních roztoků jsou

uspokojivé. Mírné odchylky od lineárního průběhu mohly být způsobeny například krátkou dobou inkubace daného kalibračního roztoku.

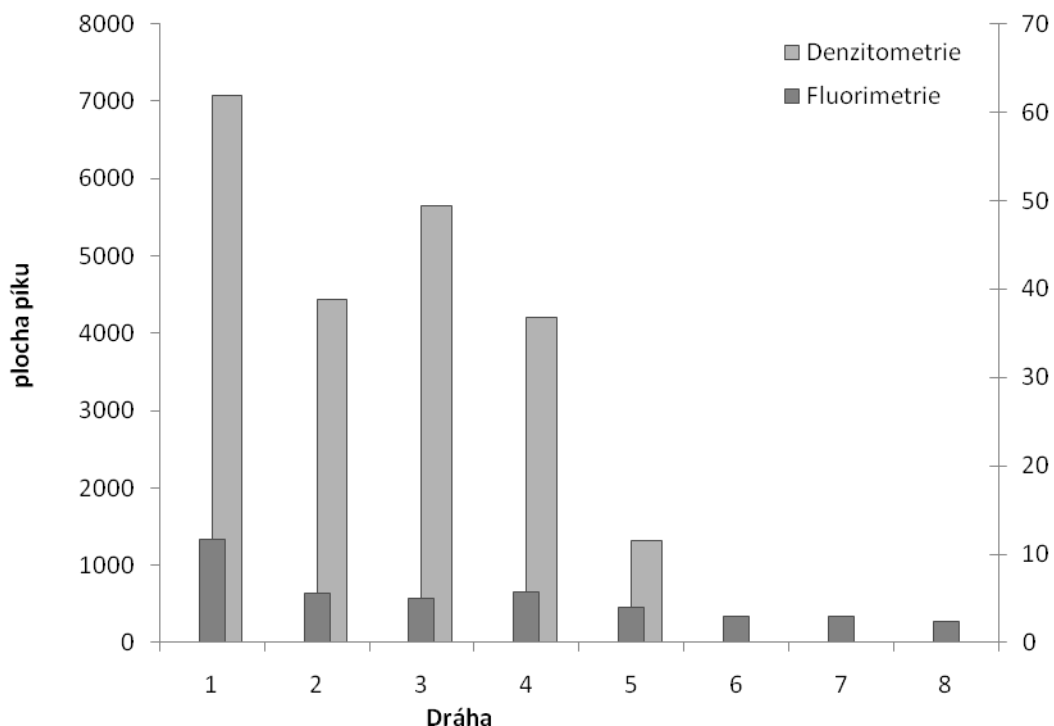
Tab. 3: Výsledky fluorimetrie pro vzorek č.10

Dráha č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Signál přístroje	1264,7	601	545,4	620,7	438,4	324	330	265,7
C_{cal}	140,4	66,36	60,16	68,56	48,21	35,45	36,12	28,94
C_{vz}	11,7	5,53	5,01	5,71	4,02	2,95	3,01	2,41

C_{cal} – koncentrace odečtená z kalibrační závislosti [ng/ml]

C_{vz} – přepočítaná koncentrace DNA v původním vzorku [$\mu\text{g/ml}$]

Naměřené signály u tohoto vzorku se pohybovali v rámci výše uvedené kalibrační závislosti.



Obr. 11: Výsledek denzitometrie vzorku č.10 a srovnání s výsledky fluorimetrického stanovení

Stanovení obsahu DNA u několika vzorků tohoto typu a srovnání s výsledky jiných metod nám prokázalo, že náš předpoklad byl mylný a

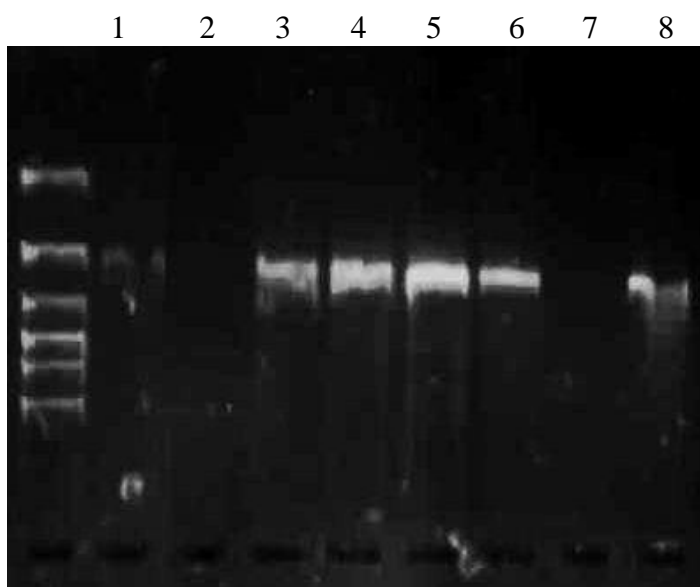
barvivo přítomné ve vzorcích výsledky našeho stanovení zkresluje. Můžeme tak usoudit z fotky, kde lze v horní části vidět přítomnost nespecifických produktů, které následně negativně ovlivňovaly námi prováděné stanovení DNA. Výsledné hodnoty koncentrací DNA ve vzorcích vycházejí příliš malé a mezi jednotlivými vzorky, které se ve skutečnosti zřejmě obsahem DNA velmi liší, se prakticky neliší.

3.2.2 Při použití GoTaq Colorless Hot Start Mastermix

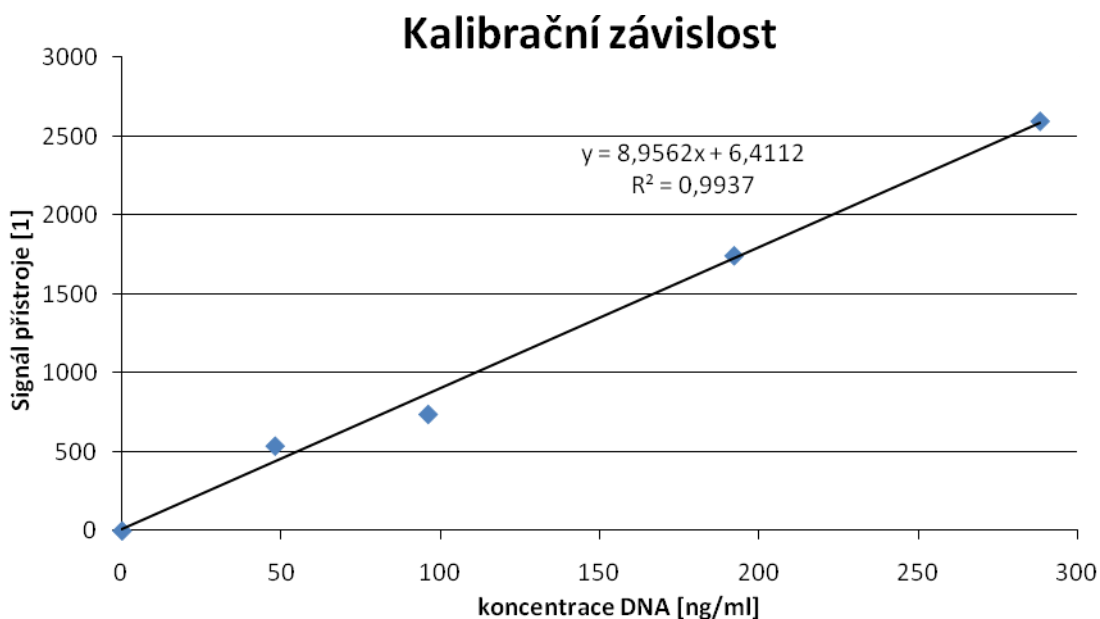
Pro další měření jsme použili taktéž produkty PCR reakce, tentokrát však s GoTaq Colorless Hot Start Mastermix, který už není zeleně zbarven, což je výhodné pro námi prováděnou metodu stanovení. V tomto případě již hodnoty měření odpovídaly výsledkům jiných metod.

3.2.2.1 Vzorek č.14

Prvním ze vzorků neobsahujících zelené barvivo byl vzorek s označením č.14. Pro stanovení jsme použili 2 μ l tohoto vzorku.



Obr. 12: Fotografie PCR produktu pro vzorek č.14



Obr. 13: Kalibrační závislost pro vzorek č.14

Proložením naměřených hodnot lineární regresí jsme získali uspokojivý průběh. Regresní koeficient v tomto případě nabył hodnoty 0,9937.

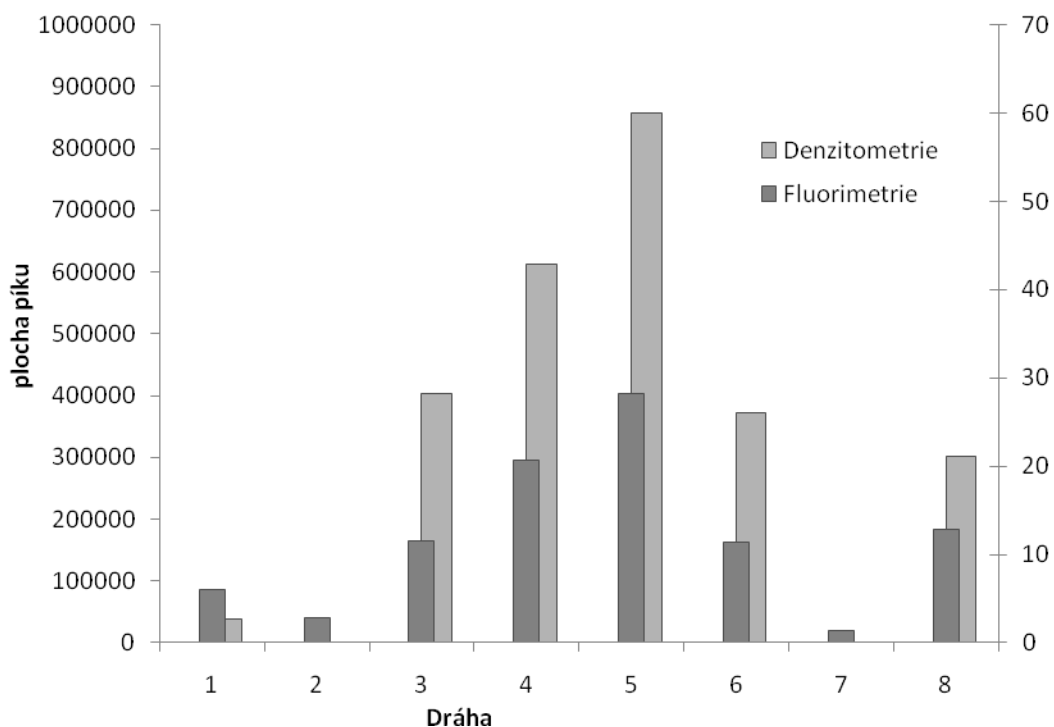
Tab. 4: Výsledky fluorimetrie pro vzorek č.14

Dráha č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Signál přístroje	436,2	276,33	830,9	1490,5	2029,5	820,5	108,7	931,2
C_{cal}	47,97	22,84	92,02	165,64	225,79	90,86	11,42	103,21
C_{vz}	6	2,86	11,5	20,7	28,22	11,36	1,43	12,9

C_{cal} – koncentrace odečtená z kalibrační závislosti [ng/ml]

C_{vz} – přepočítaná koncentrace DNA v původním vzorku [μg/ml]

Signál přístroje se opět pohyboval v námi zvoleném, užším rozsahu kalibrační závislosti.

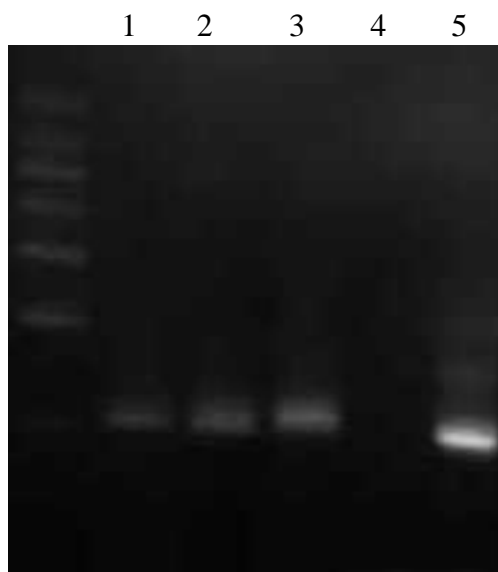


Obr. 14: Výsledek denzitometrie vzorku č. 14 a srovnání s výsledky fluorimetrického stanovení

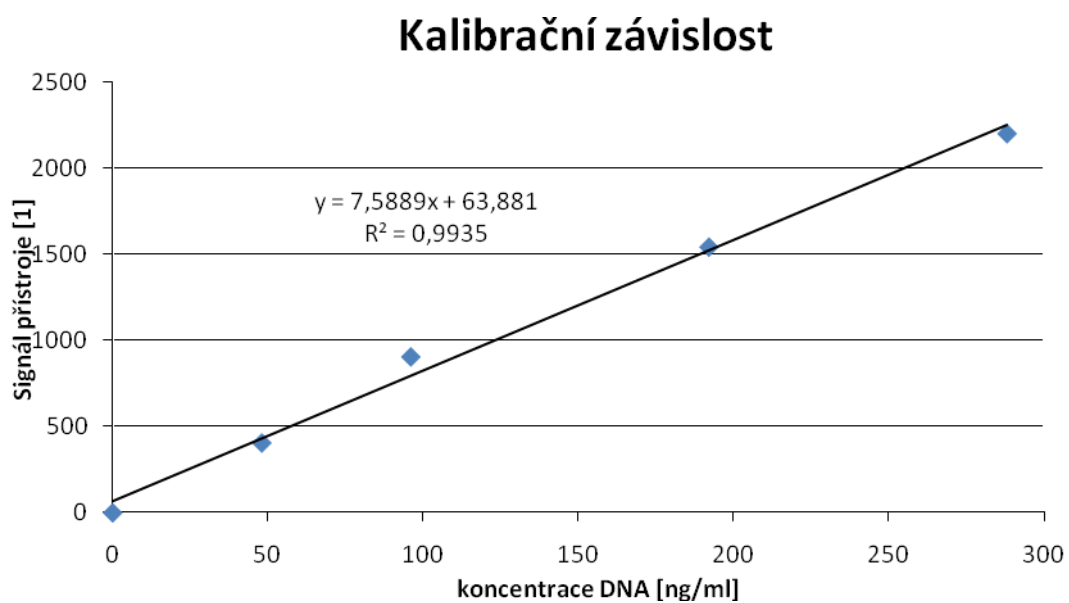
Rozdíly mezi hodnotami v jednotlivých drahách jsou již dobře rozpoznatelné, což je s největší pravděpodobností způsobeno použitím GoTaq Colorless Hot Start Mastermixu. Můžeme také vidět, že výsledné hodnoty denzitometrie jsou srovnatelné s hodnotami z fluorimetrického stanovení.

3.2.2.2 Vzorek č.17

Dalším měřeným vzorkem byl opět produkt PCR reakce označen jako č.17. Titrovaný objem vzorku byl opět 2 μ l.



Obr. 15: Fotografie PCR produktu pro vzorek č.17



Obr. 16: Kalibrační závislost pro vzorek č.17

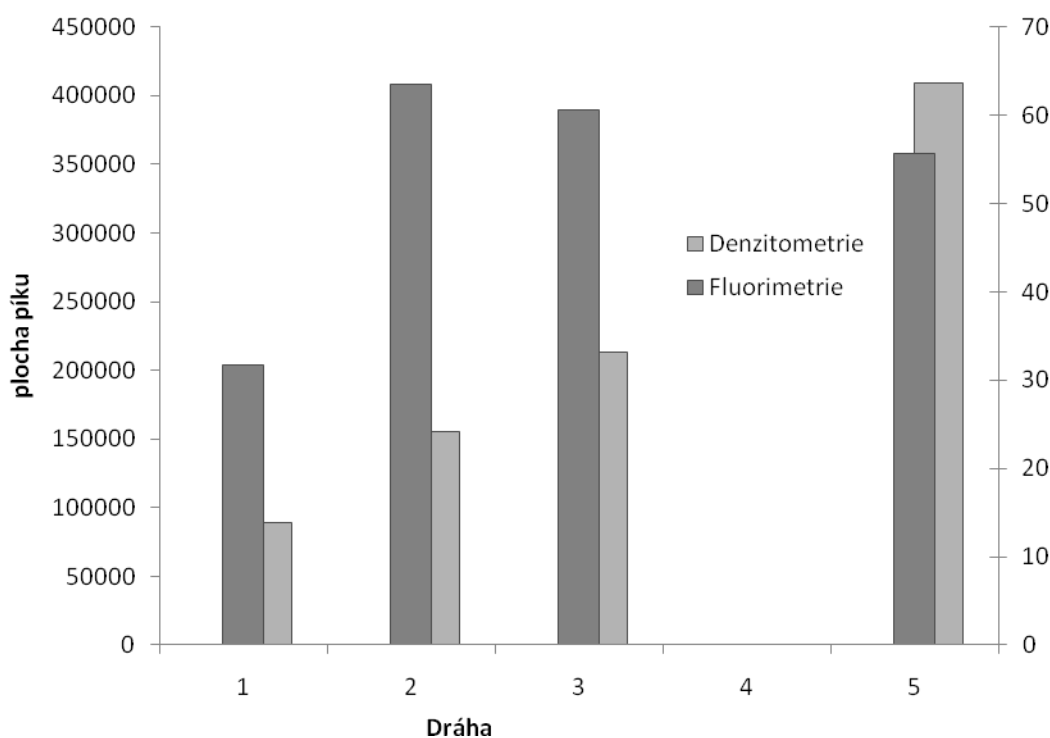
Regresní koeficient výše uvedené kalibrační závislosti svou hodnotou 0,9935 poukazuje, na dostatečnou přesnost měření.

Tab. 5: Výsledky fluorimetrie pro vzorek č.17

Dráha č.	1	2	3	4	5
Signál přístroje	1986,33	3921	3747,33	43,66	3448
C_{cal}	253,29	508,18	485,3	-2,66	445,87
C_{vz}	31,66	63,52	60,66	-0,33	55,73

C_{cal} – koncentrace odečtená z kalibrační závislosti [ng/ml]

C_{vz} – přepočítaná koncentrace DNA v původním vzorku [$\mu\text{g/ml}$]

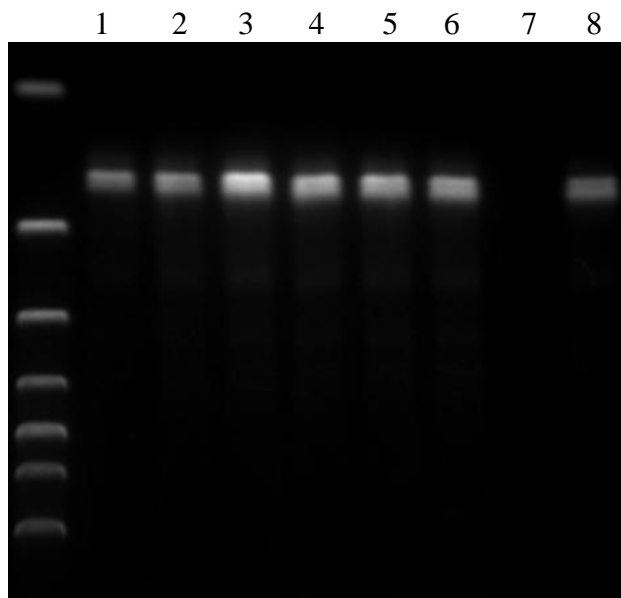


Obr. 17: Výsledek denzitometrie vzorku č.17 a srovnání s výsledky fluorimetrického stanovení

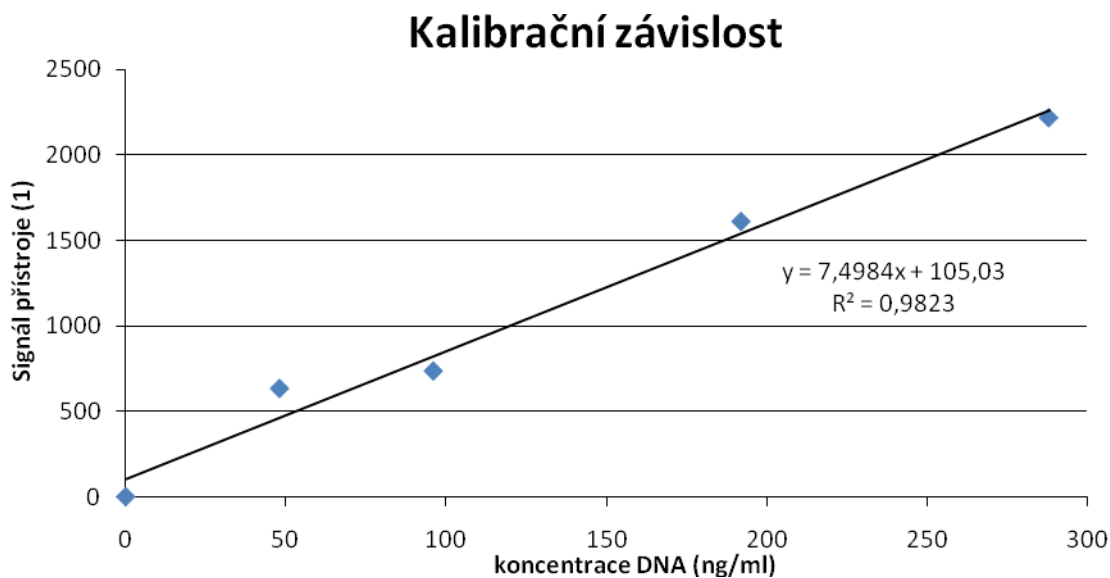
Denzitometrické výsledky u tohoto vzorku úplně neodpovídají námi naměřeným hodnotám, což můžeme vidět na Obr. 17. Denzitometrie je však pouze semikvantitativní metodou stanovení a lze proto předpokládat, že námi naměřené hodnoty jsou přesnější než hodnoty získané pomocí denzitometrie.

3.2.2.3 Vzorek č.36

Tento produkt PCR reakce označen číslem 36, byl poslední námi měřený vzorek, u kterého jsme již dosáhli výsledků srovnatelných s jinými metodami.



Obr. 18: Fotografie PCR produktu pro vzorek č.36



Obr. 19: Kalibrace pro vzorek č. 36

U grafu kalibrační závislosti pro vzorek č.36 můžeme vidět, že jednotlivé hodnoty jsou rozmístěny ve větším rozptylu okolo linearizační křivky. Tento fakt se projevil i v hodnotě regresního koeficientu, který je

v tomto případě 0,9823, což je o něco nižší než u ostatních provedených kalibrací.

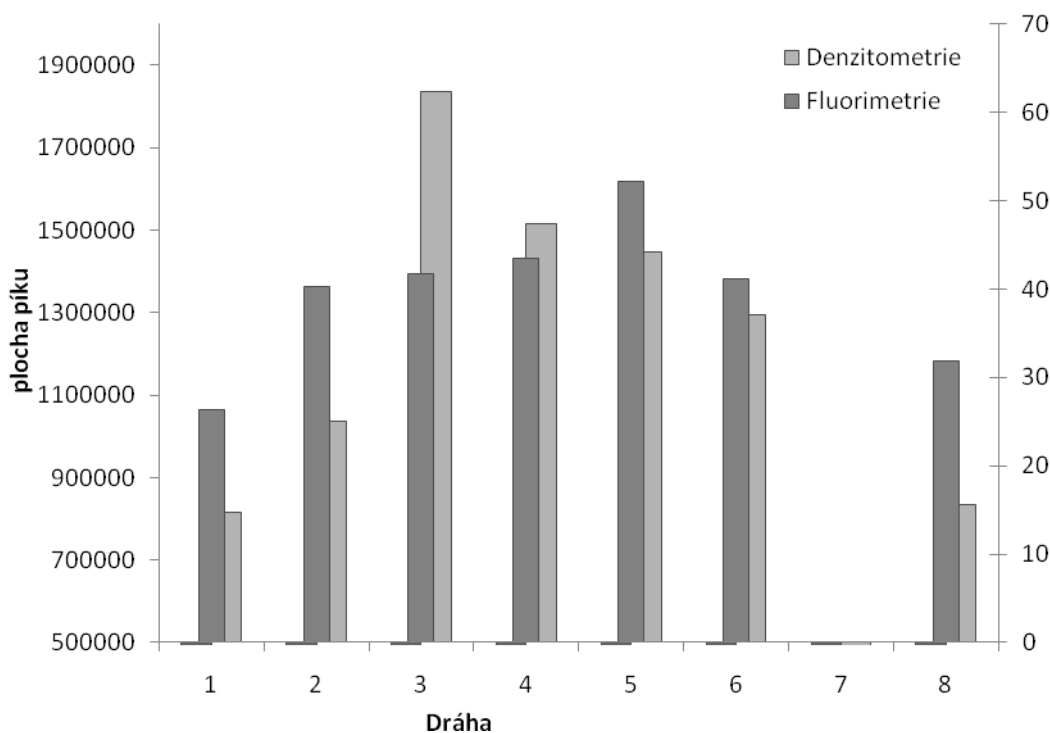
Tab. 6: Výsledky fluorimetrie pro vzorek č.36

Dráha č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Signál přístroje	1687	2525,63	2607,33	2709,63	3233,33	2573,33	-97	2015,63
C_{cal}	210,93	322,75	333,65	347,28	417,11	329,11	-26,94	254,75
C_{vz}	26,37	40,34	41,71	43,41	52,14	41,14	-3,37	31,84

C_{cal} – koncentrace odečtená z kalibrační závislosti

C_{vz} – koncentrace DNA ve vzorku [$\mu\text{g/ml}$]

Některé hodnoty signálu přístroje uvedené v Tab. 6 se pohybují mimo oblast popsanou kalibrační závislostí.



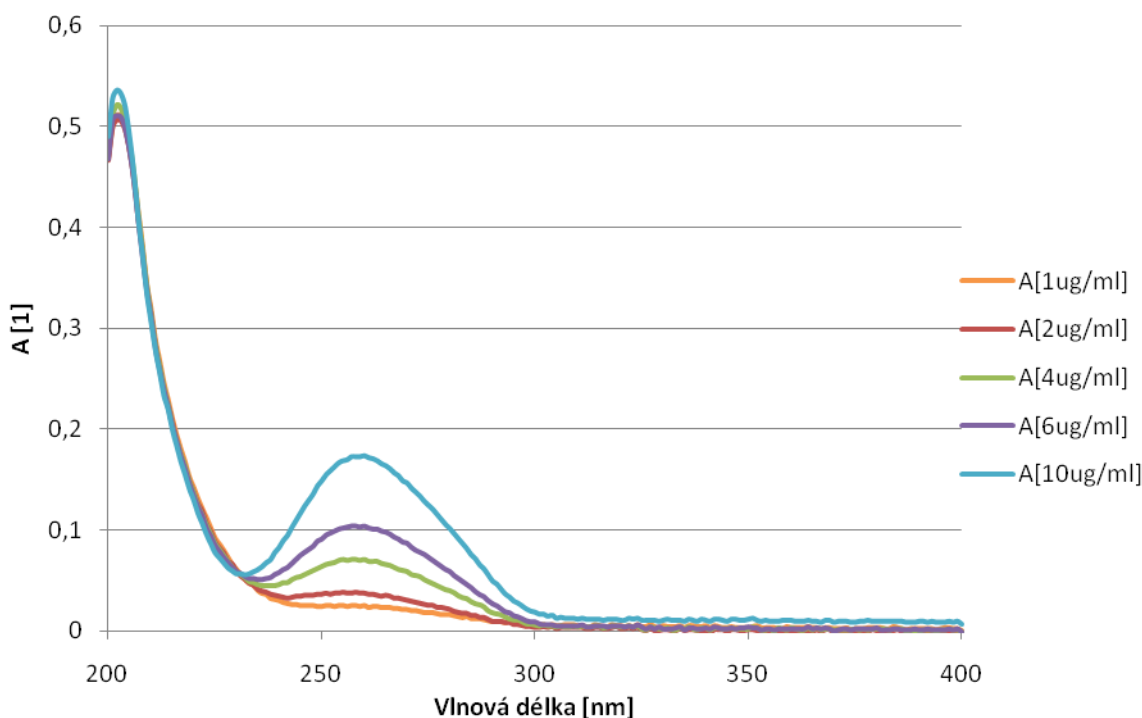
Obr. 20: Výsledek denzitometrie vzorku č.36 a srovnání s výsledky fluorimetrického stanovení

V tomto případě můžeme vidět, že naše výsledné hodnoty odpovídají jak fotografii PCR produktu, tak denzitometrii tohoto vzorku.

3.2.3 Porovnání metody s UV stanovením DNA

Stanovení DNA pomocí UV jsme prováděli pouze s roztoky standardů DNA a to o koncentracích 0, 1, 2, 4, 6 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Jako referenční vzorek byl použit pufr 1x TNE. Měření jsme prováděli v rozsahu vlnových délek 200 – 400 nm. U samotných neznámých vzorků jsme tuto metodu, z důvodu přítomnosti látek ovlivňujících toto stanovení, neprováděli.

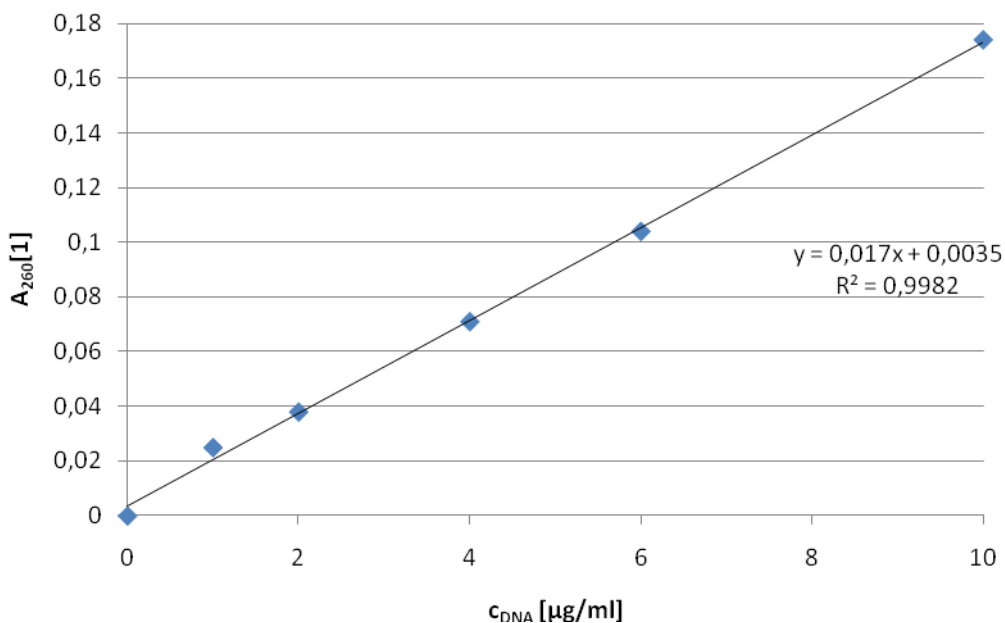
Pro samotné měření jsme si připravili roztoky standardů o výše uvedených koncentracích o objemu 0,5 ml. Do kyvet z křemenného skla jsme dávkovali 0,4 ml. Tyto kyvety jsme pak vložili do UV/VIS spektrometru. Z naměřených dat jsme následně sestrojili absorpční spektra a vypočítali, dle výše uvedených vzorců, hodnoty koncentrací standardů DNA a čistotu DNA tohoto standardu.



Obr. 21: Absorpční spektra různých koncentrací standardu DNA změřená pomocí UV/VIS spektrometrie

Na Obr. 21 je patrné, že maximum absorpce nastává při vlnové délce 260 nm. Z naměřených absorpčních spekter můžeme vidět, že pro použití

této metody na stanovení obsahu DNA v neznámém vzorku by bylo potřeba, aby koncentrace analytu byla alespoň 2 $\mu\text{g/ml}$. Další nevýhodou je objem vzorku potřebný pro stanovení, který musí být minimálně 350 μl .



Obr. 22: Kalibrační závislost pro metodu UV/VIS spektrometrii

Tab. 7: Hodnoty standardu DNA vypočtené na základě měření pomocí UV/VIS spektrometrie

$C_{\text{DNA}}(\text{teor.})$	1	2	4	6	10
C_{DNA}	1	1,75	3,35	4,95	8,15
Čistota DNA	1,82	1,84	1,86	1,83	1,79

C_{DNA} - Koncentrace DNA ($\mu\text{g/ml}$) vypočtená z grafu podle vztahu $c [\mu\text{g/ml}] = (A_{260} - A_{320}) * 50$

V Tab. 7 vidíme, že zpětně vypočítané hodnoty koncentrací daných roztoků se od skutečných hodnot koncentrací liší jen nepatrně. Vypočtená čistota DNA, která se pohybuje v rozmezí od 1,79 do 1,86, nám ukazuje, že se jedná o vysoce kvalitní vzorek DNA.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu fluorimetrického stanovení DNA v produktech PCR reakcí a korelovat získané výsledky s jinými metodami. V této práci jsou výsledky srovnávány s denzitometrií PCR produktů po jejich vizualizaci na agarózovém gelu pomocí fluorescenčního barviva. Tato metoda stanovení je však pouze semikvantitativní. V této práci je také zmíněno stanovení pomocí UV/VIS spektrometrie, které je však nevhodné pro naše stanovení, ať už díky nedostatečnému objemu neznámých vzorků či nízké koncentraci DNA v těchto vzorcích. Dalším z cílů byla minimalizace objemu vzorku potřebného pro stanovení.

Jako první typ vzorků byly použity produkty PCR získané pomocí GoTaq Green Hot Start Mastermixu, který obsahuje zelené barvivo, umožňující přímou aplikaci PCR produktů na agarózový gel. Srovnáním výsledků s ostatními metodami jsme zjistili, že toto obsažené barvivo, i přes zředění námi stanovovaných vzorků, zhasí fluorescenci a tím negativně ovlivňuje výsledky stanovení. Proto jsme jako další vzorky použili také produkty PCR reakce, ale tentokrát s GoTaq Colorless Hot Start Mastermix, které neobsahuje zmíněné zelené barvivo a neovlivňuje tak fluorimetrické stanovení. Postup měření jsme upravili tak, že pro stanovení bylo třeba jen 2 μ l každého z měřených vzorků.

Závěrem můžeme říci, že se nám podařilo tuto metodu úspěšně použít při stanovení obsahu DNA v produktech PCR reakce. Jedná se o metodu vysoce citlivou a díky tomu nám ke stanovení stačily pouze 2 μ l vzorku. Další nespornou výhodou této metody je schopnost stanovit obsah DNA i v nepurifikovaných vzorcích, obsahujících další složky jako jsou enzymy, primery atd. V takových vzorcích není v principu možné stanovení DNA pomocí UV metody.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 1. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [2] *Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti* [online], poslední revize 16.4.2010 [cit.2011-04-16]. Dostupné z: <http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm>.
- [3] *Fluorimetry principle* [online, cit.2011-04-16]. Dostupné z: <<http://www.tadjhizyaran.org/Default.aspx?tabid=101&articleType=ArticleView&articleId=21>>.
- [4] Sigma-Aldrich Corp.. *DNA Quantitation Kit, Fluorescence Assay (DNAQF) – Technical Bulletin* [online], poslední revize 16.7.2009 [cit. 2010-09-29]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/dnaqfbul.Par.0001.File.tmp/dnaqfbul.pdf>>.
- [5] *Principy fluorescenční spektroskopie* [online], poslední revize 5.2.2008 [cit.2011-04-29]. Dostupné z: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>>.
- [6] *MMDB Protein Structure Summary, 449D, 54662* [online, cit.2011-02-24]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=54662>>.
- [7] *Hoechst stain-wikidoc* [online], poslední revize 19.4.2011 [cit.2011-04-23]. Dostupné z: <http://www.wikidoc.org/index.php/Hoechst_stain>.
- [8] MOE,D., GARBARSCHE,C., KIRKEBY,S. The protein effect on determination of DNA with Hoechst 33258. *Journal of Biochemical and biophysical Methods*, 1994, Volume 28, Issue 4, s.263-276

- [9] Turner Biosystems, Inc. *A 20/20ⁿ Method for DNA Quantitation Using, Hoechst 33258* [online, cit.2010-09.20]. Dostupné z: <<http://www.luminometer.com/doc/appnotes/PDF/S-0110.pdf>>.
- [10] *Single Tube Luminometer* [online], poslední revize 14.11.2009 [cit.2011-04-07].
Dostupné z: <http://www.il-13.com/Single_Tube_Luminometer.htm>.
- [11] *How do I determine the concentration, yield and purity of DNA sample?* [online, cit.2011-02-28]. Dostupné z: <<http://www.promega.com/enotes/faqspeak/fq0059.htm>>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DNA	Kyselina deoxyribonukleová
AT	Adenin-thymin
PCR	Polymerázová řetězová reakce
UV	Ultrafialová oblast světla
UV/VIS	Ultrafialová nebo viditelná oblast záření
EDTA	Kyselina etylendiamintetraoctová
RNA	Kyselina ribonukleová
TNE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
NaCl	Chlorid sodný
M	Jednotka koncentrace mol/l

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Zobecněný Jablonského diagram	8
Obr. 2: Schéma fluorimetru	8
Obr. 3: Vazba barviva H 33258 na DNA.....	9
Obr. 4: Vzorec barviva H 33258.....	10
Obr. 5: Fluorescenční emisní spektrum barviva H 33258	10
Obr. 6: Luminometr 20/20 ⁿ s UV fluorescenčním modulem.....	14
Obr. 7: Kalibrační graf pro stanovení koncentrace DNA	17
Obr. 8: Kalibrační závislost pro stanovení DNA se zúženým rozsahem koncentrací standardů	18
Obr. 10: Kalibrační závislost změřená před stanovením obsahu DNA ve vzorku č.10	19
Obr. 9: Fotka PCR produktu pro vzorek č.10	19
Obr. 11: Výsledek denzitometrie vzorku č.10 a srovnání s výsledky fluorimetrického stanovení	20
Obr. 12: Fotografie PCR produktu pro vzorek č.14	21
Obr. 13: Kalibrační závislost pro vzorek č.14	22
Obr. 14: Výsledek denzitometrie vzorku č. 14 a srovnání s výsledky fluorimetrického stanovení	23
Obr. 15: Fotografie PCR produktu pro vzorek č.17	24
Obr. 16: Kalibrační závislost pro vzorek č.17	24
Obr. 17: Výsledek denzitometrie vzorku č.17 a srovnání s výsledky fluorimetrického stanovení	25
Obr. 18: Fotografie PCR produktu pro vzorek č.36	26
Obr. 19: Kalibrace pro vzorek č. 36	26
Obr. 20: Výsledek denzitometrie vzorku č.36 a srovnání s výsledky fluorimetrického stanovení	27
Obr. 21: Absorpční spektra různých koncentrací standardu DNA změřená pomocí UV/VIS spektrometrie	28
Obr. 22: Kalibrační závislost pro metodu UV/VIS spektrometrii	29

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Pipetované objemy pro kalibraci (μl)	16
Tab. 2: Pipetované objemy v případě užšího rozsahu koncentrací (μl)	17
Tab. 3: Výsledky fluorimetrie pro vzorek č.10	20
Tab. 4: Výsledky fluorimetrie pro vzorek č.14	22
Tab. 5: Výsledky fluorimetrie pro vzorek č.17	25
Tab. 6: Výsledky fluorimetrie pro vzorek č.36	27
Tab. 7: Hodnoty standardu DNA vypočtené na základě měření pomocí UV/VIS spektrometrie	29

SEZNAM PŘÍLOH

P I Návod na fluorimetrické stanovení

EVIDENČNÍ LIST BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení bakalářské práce)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Název bakalářské práce	Stanovení DNA fluorimetricky
Autor bakalářské práce	Lenka Böhmová
Vedoucí bakalářské práce	doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	nám. T.G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín
Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení DP	2011
Počet stran	36
Počet svazků	3
Vybavení (obrázky, tabulky...)	Obrázky 22, tabulky 7
Klíčová slova	DNA, fluorimetrie, barvivo Hoechst 33258

PŘÍLOHA P I: NÁVOD NA PROVEDENÍ FLUORIMETRICKÉHO STANOVENÍ

1. Příprava roztoků

- Pufr 10x TNE: dodaný v kitu
- Pufr 1x TNE: 1 ml pufru 10x TNE smíchejte s 9 ml vody pro molekulární biologii
- Roztok barviva 1B: 10 μ l základního roztoku barviva B ($c = 10\text{mg/ml}$) smíchejte s 990 μ l vody pro molekulární biologii, vzniklý zásobní roztok uchovávejte ve tmě při 5°C.
- Roztok barviva 2B: 10 μ l barviva 1B ($c = 0,1\text{mg/ml}$) smíchejte s 4,99 ml pufru 1x TNE. Tento vzniklý roztok připravujte vždy čerstvě před vlastním stanovením.
- Zásobní roztok DNA: 10 μ l základního roztoku DNA ($c = 1\text{mg/ml}$) smíchejte se 100 μ l 10x TNE pufru a 890 μ l vody pro molekulární biologii. Vzniklý roztok uchovávejte při 5°C

2. Vlastní provedení

Na základě níže uvedené tabulky připravte kalibrační roztoky v mikrotitrační destičce.

Tabulka 1: Tabulka pipetování pro sestavení kalibrační křivky

Koncentrace kalibračních roztoků DNA [ng/ml]	0	48	96	192	288
Objem standardu DNA o $c=10$ $\mu\text{g/ml}$ [μ l]	0	6	12	24	36
Objem pufru 10x TNE [μ l]	25	25	25	25	25
Objem vody pro molekulární biologii [μ l]	225	219	213	201	189

Kalibrační roztoky smíchejte v další jamce mikrotitrační destičky s barvivem 2B v objemech 100 μ l vzorku a 100 μ l barviva 2B, vzniklou směs důkladně promíchejte a poté nadávkuje 150 μ l do mikrokvet a ponechte 2-5 minut ve tmě inkubovat.

2 μ l neznámého vzorku smíchejte s 25 μ l 10x TNE pufru a doplňte vodou pro molekulární biologii na objem 250 μ l. 100 μ l vzniklého roztoku smíchejte s roztokem barviva 2B v poměru 1:1. Poté odeberte 150 μ l připravené směsi do mikrokvet a ponechte 2-5 minut ve tmě k inkubaci.

Proveďte měření na přístroji Luminometer 20/20ⁿ, měření proveďte 3x vedle sebe.

Koncentraci DNA ve vzorku vypočtete z rovnice kalibrační křivky a přepočítejte na koncentraci v původním vzorku.