Ćwiczenie 8

Oczyszczanie i analiza kwasów nukleinowych cz. 2: Analiza DNA metodą elektroforezy Analiza DNA metodą spektrofotometrii

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Cząsteczki DNA zwykle poddaje się elektroforezie w żelu agarozowym. Najczęściej stosuje się stężenia agarozy wahające się między 0,8% a 2,0% w buforze TAE (w/v) zapewniającym przepływ prądu przez żel, stałą wartość pH, a także minimalizującym aktywność nukleaz (dzięki obecności EDTA kompleksującego dwuwartościowe kationy będące kofaktorami tych enzymów). Stężenie żelu zależy od wielkości cząsteczek DNA poddawanym rozdziałowi (Tab. 1.). Jeszcze mniejsze cząsteczki DNA można rozdzielać również w żelu poliakrylamidowym. Niezależnie do rodzaju żelu, z uwagi na ładunek ujemny cząsteczek DNA, ich migracja przebiega od katody (ze znakiem ujemnym) w kierunku anody (ze znakiem dodatnim). Najmniejsze cząsteczki DNA migrują najszybciej, a cząsteczki największe najwolniej. Śledzenie postępów elektroforezy umożliwiają barwniki naładowane ujemnie, które dodaje się do preparatów DNA przed rozpoczęciem elektroforezy. Do najczęściej stosowanych barwników należą: oranż G i błękit bromofenolowy migrujące jak cząsteczki DNA o wielkości, odpowiednio, 50 pz [bp] i 500 pz [bp]. Niezależnie od rodzaju żelu użytego do rozdziału DNA, jego uwidocznienie w żelu wymaga barwników wnikających do przestrzeni między poszczególnymi parami zasad w dwuniciowej cząsteczce DNA. Najczęściej stosuje się w tym celu bromek etydyny, który wzbudzony promieniowaniem UV w kompleksie z cząsteczką DNA emituje światło o długości fali 590 nm (kolor pomarańczowo-ceglany). Ze względu na właściwości interkalujące, bromek etydyny jest zaliczany do niebezpiecznych dla zdrowia mutagenów. Długotrwała ekspozycja na promieniowanie UV również nie jest wskazana. Podczas obserwacji wyników elektroforezy DNA należy więc zachować szczególną ostrożność zakładając rękawiczki oraz stosując odpowiednie osłony wykonane ze szkła akrylowego. W ostatnich latach coraz częściej stosuje się barwniki mniej szkodliwe niż bromek etydyny, np. Midori Green Advance, którego kompleksy z DNA wzbudzane są przez UV (a także przez światło niebieskie) i emitują światło w kolorze zielonym.

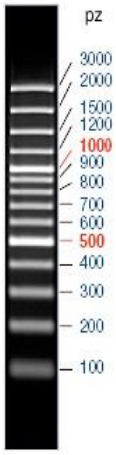
Tabela 1. Zależność między stężeniem żelu agarozowego i wielkością rozdzielanych cząsteczek DNA

stężenie żelu (%)	**wielkość rozdzielanych cząsteczek DNA (pz [bp])**
0,8	800-12000
1,0	500-10000
1,2	400-7000
1,5	200-4000
2,0	50-2000

Aparatura i odczynniki

- Aparat do elektroforezy z zasilaczem prądu stałego
- Transiluminator UV
- Pipeta automatyczna (2-20 µl)
- Żel agarozowy 1,5% (w/v) z dodanym barwnikiem Midori Green Advance, w buforze TAE
- Bufor TAE o składzie: 40 mM Tris-octan (pH 8,0), 1 mM EDTA

- Mieszanina PCR z poprzednich zajęć po przeprowadzonej amplifikacji fragmentu chromosomu 5
- Roztwór barwnika oranż G o składzie: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,15% oranż G, 60% glicerol, 60 mM EDTA
- Wzorzec wielkości DNA 100 bp Ladder Plus z firmy Fermentas (Rys. 1.)



Rys. 1. Układ fragmentów DNA po elektroforezie przeprowadzonej w 1,5% żelu agarozowym. Wartości liczbowe podane po prawej stronie odpowiadają liczbie par zasad (pz [bp]), z których składają się poszczególne fragmenty DNA.

Wykonanie ćwiczenia

1. Do mieszaniny PCR po amplifikacji fragmentu chromosomu 5 (obj. 20 µl) dodać 5 µl roztworu barwnika oranż G. Dokładnie wymieszać.
2. Nanieść 20 µl preparatu z pkt. 1. do wskazanej studzienki w żelu agarozowym.
3. Jedna studzienka na żelu powinna zawierać wzorzec wielkości DNA (Rys. 1.) o obj. 6 µl (nie ma potrzeby dodawania roztworu barwnika oranż G).
4. Po naniesieniu wszystkich preparatów należy podłączyć odpowiednimi kablami zasilacz i przyłożyć napięcie ok. 110 V prądu stałego. Elektroforezę prowadzić do momentu dotarcia barwnika oranż G do końca żelu agarozowego (do końca od strony dodatniej anody).
5. Ostrożnie położyć żel na transiluminatorze UV.
   UWAGA! Żel agarozowy jest dość łamliwy.
   UWAGA! Barwnik fluorescencyjny Midori Green Advance obecny w żelu jest związkiem interkalującym pomiędzy pary zasad w DNA i stąd potencjalnym kancerogenem. Wszelkie czynności mogące spowodować kontakt z tą substancją powinny być wykonywane w rękawiczkach!
   UWAGA! Promieniowanie UV jest szkodliwe dla zdrowia. Należy stosować odpowiednie osłony z pleksi i okulary ochronne!
6. Zaobserwować układ prążków pojawiających się pod wpływem UV (kompleksów DNA z barwnikiem absorbujących światło UV i świecących na zielono - Em_{max} ok. 530 nm) - *najlepiej szybko zrobić zdjęcie smartfonem*.
7. **Na potrzeby zaliczenia** wykonać rysunek żelu, zaznaczając położenie anody i katody oraz studzienek, kierunek migracji, położenie wzorców po elektroforezie, położenie prążka lub prążków w swojej próbce oraz w wybranych próbkach innych osób, których obraz odbiega od swojej (wraz z szacowaną ich wielkością w pz [bp] i interpretacją, który z nich zawiera sekwencję *Alu*; użyć pojęć homozygota i heterozygota).

Spektrofotometria DNA

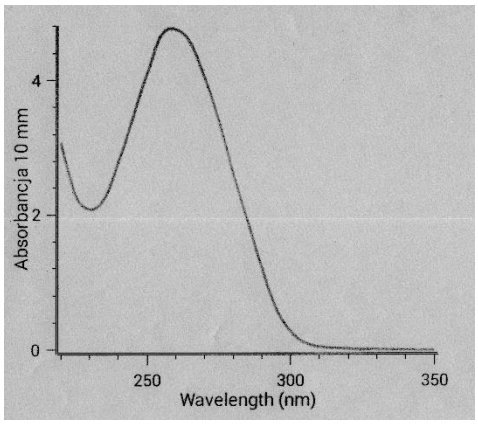
Wszystkie zasady azotowe (Ade, Gua, Cyt, Ura, Thy), a także ich pochodne: nukleozydy (A, dA, G, dG, C, dC, U, dT), nukleotydy, oligonukleotydy i polinukleotydy (w naturze **kwasy nukleinowe** - DNA i RNA) absorbują światło UV, nawet bez obecności dodatkowych barwników jak Midori Green Advance czy bromek etydyny (klasyczny barwnik fluorescencyjny stosowany do wykrywania kw. nukleinowych), dając charakterystyczne widma z **maksimum absorbcji przy długości fali ok. 260 nm i jej minimum ok. 230 nm**. (Rys. 2). Tę właściwość można wykorzystać do stwierdzenia obecności tych substancji w roztworze, a także do określenia ich stężenia. Dla czystego roztworu *dwuniciowego* **DNA o stężeniu 50 µg/ml**, przy długości drogi światła 1 cm, **absorbancja przy 260 nm (A_{260}) wynosi 1,0**. Dla RNA, taką wartość A_{260} osiąga roztwór o stężeniu 40 µg/ml (z powodu braku oddziaływań warstwowych, gdyż RNA jest jednoniciowy - *patrz poniżej*). Należy jednak pamiętać, że przy takim samym stężeniu wagowym, roztwór zawierający krótkie cząsteczki kwasu nukleinowego (np. plazmidowy DNA) będzie miał wyższe stężenie molowe niż roztwór zawierający długie cząsteczki (np. duże fragmenty DNA z chromosomów eukariotycznych).

Denaturacja DNA (przejście w postać jednoniciową, np. poprzez podgrzanie jego roztworu do 95-100°C) powoduje wzrost absorpcji UV - jest to tzw. **efekt hiperchromowy** i wynika on z uwolnienia elektronów w pierścieniach zasad azotowych od oddziaływań warstwowych (ten efekt będzie jeszcze większy, kiedy DNA ulegnie hydrolizie do wolnych nukleotydów). Ponieważ, na ogół absorpcję mierzy się w temp. pokojowej, roztwór DNA po denaturacji szybko chłodzi się poprzez przeniesienie go do łaźni lodowej (ok. 0°C), co zapobiega jego spontanicznej renaturacji (odtworzeniu dwuniciowej struktury i oddziaływań warstwowych), a potem przenosi się do temp. pokojowej i dokonuje się pomiaru (w stanie nadal zdenaturowanym; porównaj Rys. 2 i Rys. 3). W zależności od składu zasad azotowych, maksymalny efekt hiperchromowy (przyrost A_{260}) może wynosić ok. 40%.

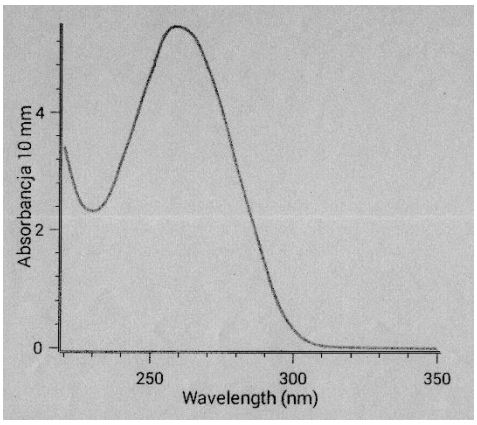
Ponadto, obecność w roztworze niektórych substancji (także absorbujących UV) może zakłócać pomiary spektrofotometryczne kwasów nukleinowych, np. oznaczanie ich stężenia (a także interferować z dalszym wykorzystaniem preparatu kwasu nukleinowego, zwłaszcza, jeśli będzie to jakaś reakcja enzymatyczna, np. trawienie enzymami restrykcyjnymi lub synteza z udziałem polimerazy; uwaga, tego typu interferencja *nie* jest już związana ze zdolnością do absorpcji UV). Przykładami takich substancji są **białka, sole chaotropowe** (np. izotiocyjanian lub chlorowodorek guanidyny) i **fenol** (te substancje albo współoczyszczają się wraz z kwasami nukleinowymi [białka], albo bywają wykorzystywane przy ich oczyszczaniu [sole chaotropowe i fenol]). O ich obecności może świadczyć zmienione widmo w UV. W przypadku fenolu, obserwuje się przesunięcie maksimum absorbancji w stronę 270 nm (Rys. 4), a przy białku, wzrost A_{280} (białka absorbują UV z maksimum przy 280 nm dzięki resztom tyrozyny i tryptofanu), a także wzrost A_{230} (ale taki wzrost nie jest charakterystyczny jedynie dla białka; Rys. 5). Ponieważ sam fenol silnie absorbuje UV przy 260 nm, w jego obecności nie można *prosto* oznaczyć prawidłowego stężenia kwasu nukleinowego (jest ono zawyżone). Nie każda substancja absorbująca UV zakłóca pomiary spektrofotometryczne kwasów nukleinowych. Dla przykładu, sól dwusodowa **EDTA**, którą dodaje się do roztworów DNA, aby zahamować jego degradację przez jedną z DNaz (poprzez wyłapywanie jonów Mg^{2+}, które są kofaktorem dla tej DNazy), wykazuje wysoką absorpcję przy 230 nm, ale nie absorbuje przy 260 nm, tak więc w jego obecności, oznaczenie stężenia kw. nukleinowego będzie prawidłowe (jednak może ona interferować z działaniem polimeraz, które również do swej aktywności wymagają obecności jonów Mg^{2+}).

Najczęściej, nie analizuje się jednak całych widm, tylko sprawdza się dwa parametry (dwa stosunki absorbancji): A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}, które w przypadku bardzo czystego DNA powinny wynosić, odpowiednio, powyżej 1,8 i powyżej 2,0 (dla czystego RNA mogą być nawet trochę wyższe). Mniejsze wartości świadczą o obecności zanieczyszczeń (choć nie zawsze ich natura jest znana).

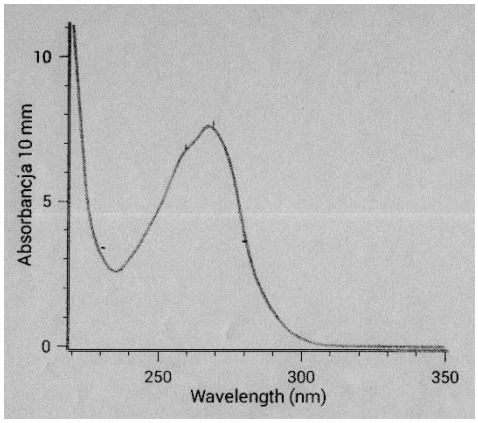
W każdym przypadku, jako próbę ślepą do zerowania spektrofotometru, należy używać roztworu, w którym rozpuszczony jest oznaczany kwas nukleinowy.



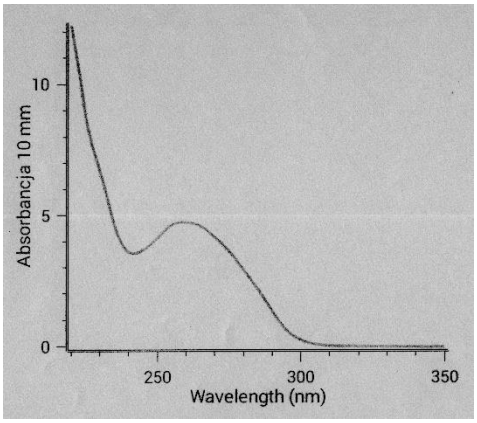
Rys. 2. Widmo absorpcji w UV preparatu (roztworu) czystego DNA. Widać wyraźne maksimum przy 260 nm i minimum przy 230 nm.



Rys. 3. Widmo absorpcji w UV preparatu czystego DNA (z Rys. 2) po denaturacji. Widać wzrost absorpcji przy 260 nm (o ok. 15%) i przy 230 nm (cała krzywa przesunęła się w górę).



Rys. 4. Widmo absorpcji w UV preparatu DNA zanieczyszczonego fenolem. Widać przesunięcie maksimum w stronę 270 nm (i minimum w stronę 240 nm) oraz wzrost absorpcji przy 260 nm (uwaga, zmiana skali na osi rzędnych w stosunku do Rys. 2 i 3).



Rys. 5. Widmo absorpcji w UV preparatu DNA zanieczyszczonego białkiem. Widać wzrost absorpcji przy 280 nm (łagodniejszy spadek z prawej strony krzywej).

Pomiary absorbcji można wykonywać w typowych spektrofotometrach, które dodatkowo wyposażone są w źródło UV (np. lampę deuterową), ale należy używać kuwet kwarcowych (szklane lub zwykłe plastikowe nie przepuszczają UV). Istnieją wyspecjalizowane, nieduże spektrofotometry, w których do pomiaru używa się niewielkich ilości roztworu nakładanego w postaci kropli bezpośrednio na powierzchnię pola pomiarowego (bez użycia kuwet; przykładem takiego urządzenia jest używany w tym ćwiczeniu aparat NanoDrop One™). Po wybraniu odpowiedniej opcji (w tym ćwiczeniu "dsDNA", ang. *double strand DNA*), urządzenie automatycznie wykonuje widmo w UV

i oblicza stężenie DNA oraz parametry A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}. Takie urządzenie pozwala bardzo szybko dokonać analizy licznych próbek przy zużyciu tylko 1-2 µl z każdej z nich (także bardzo wygodne, kiedy cała objętość roztworu izolowanego DNA wynosi jedynie kilkanaście czy kilkadziesiąt µl).

Aparatura i odczynniki

- Aparat NanoDrop One™ z podłączoną drukarką (załadowaną papierem z recyklingu)
- Sucha łaźnia (Termoblock) nastawiona na 100°C
- Łaźnia lodowa (ok. 0°C)
- Pipety automatyczne (2-20 µl i 20-200 µl)
- Woda dejonizowana (destylowana), tj. wolna od DNA i RNA oraz DNaz i RNaz
- Statyw na probówki typu eppendorf (1,5 ml) z
  roztworem czystego DNA z *Bos taurus* (probówka 1)
  roztworem tego DNA z domieszką białka (probówka 2)
  roztworem tego DNA z domieszką fenolu (probówka 3)

Wykonanie ćwiczenia

1. Z probówki 1 przenieść 100 µl roztworu czystego DNA do probówki eppendorfa podpisanej jako 4.
2. Wstawić probówkę 4 (z zamkniętym wieczkiem!) do suchej łaźni nastawionej na 100°C (uważać, aby się nie oparzyć!) i trzymać ją tam przez 5 min.
3. Przełożyć probówkę 4 szybko (jednym ruchem) do łaźni lodowej i trzymać ją tam przynajmniej przez 5 min.
4. Na 5 min. przed pomiarami, przenieść probówkę 4 do statywu z probówkami 1-3.
5. Przystąpić do pomiarów przy pomocy aparatu NanoDrop One™ - upewnić się, że została wybrana opcja "dsDNA".
6. Nanieść 2 µl wody dejonizowanej dokładnie na pole pomiarowe i położyć na nim ruchome ramię aparatu (uruchamiając pomiar - teraz próby ślepej, czyli tzw. zerowanie aparatu); zdjąć końcówkę z pipety automatycznej.
7. Zaraz po wykonaniu pomiaru, delikatnie ale całkowicie zetrzeć resztki roztworu z pola pomiarowego i ramienia, za pomocą miękkiej bibułki (nie pozwolić na ich wyschnięcie na ich powierzchni).
8. Nanieść 2 µl z probówki 1 na pole pomiarowe, położyć na nim ramię aparatu i po zakończeniu pomiaru, zetrzeć resztki roztworu.
9. Powtórzyć pomiary dla probówek 2-4 (zawsze nową, czyli czystą końcówką nanosić 2 µl roztworu i ścierać ten roztwór zaraz po pomiarze).
10. *Osoby zainteresowane mogą także dokonać analizy spektrofotometrycznej izolowanego przez siebie DNA (należy go rozmrozić i ogrzać jeszcze przed przystąpieniem do pomiarów!).*
11. Wydrukować tabelę ze wszystkimi dokonanymi przez siebie pomiarami (lub zapisać te wartości).
12. Zapoznać się z dostępnymi na sali, wydrukowanymi widmami roztworów z probówek 1-4 (zwrócić uwagę na długość fali UV, przy której występuje maksimum i minimum absorbcji w każdym widmie; nie dać się wprowadzić w błąd przez zmienną skalę absorbancji!).
13. **Na potrzeby zaliczenia**, podać stężenie czystego DNA w µg/µl i mg/ml, obliczyć efekt hiperchromowy (stosunek A_{260} po denaturacji do A_{260} przed denaturacją), podać maksima i minima absorbcji (długości fal UV) i parametry A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} dla probówek 1-3 i podsumować efekty obecności domieszek białka lub fenolu w preparacie DNA.