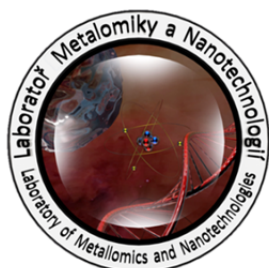


Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



PROTOKOL: Experimenty s deoxyribonukleovou kyselinou vykazující peroxidázovou aktivitu

VYUČUJÍCÍ: Ing. Branislav Ruttkay-Nedecký, PhD.,

Ing. Lukáš Nejd

Anotace

DNA obsahující na guanin bohaté sekvence se může sestavit do čtyřvláknových struktur známých jako G-kvadruplexy. Tyto útvary jsou tvořeny skládáním planárních guaninových tetrad (G-tetrád) nad sebe. G-tetráda je tvořena čtyřmi guaninovými bázemi, které jsou mezi sebou propojeny dvěma vodíkovými můstky Hoogsteenovými vazbami. G-kvadruplex tvoří několik těchto tetrad uspořádaných nad sebou. Udržení stability G-kvadruplexů napomáhá přítomnost iontů alkalických kovů, které se nacházejí uprostřed mezi dvěma G-tetrádami. Nejčastěji je tímto iontem kation draslíku. V lidském genomu, se tyto na guanin bohaté sekvence schopné tvořit G-kvadruplexy vyskytují v telomerách, i v promotorových oblastech některých onkogenů. G-quadruplexy mohou sloužit také jako ligandy pro kovové ionty a aptamery pro různé molekuly. Zajímavé je, že G-quadruplexy vykazují peroxidázovou aktivitu ve spojení s aniontovým porfyrinem heminem. Komplexy G-kvadruplexů s heminem umožnily rozvoj citlivých technik pro detekci těžkých kovů.

Postup vytvoření G-kvadruplexu

Prvním krokem k zavedení metody pro detekci stříbrných iontů pomocí G-kvadruplexu je vytvoření G-kvadruplexu v přítomnosti draselných iontů a heminu. Postup byl převzat z publikace Zhou et al. 2010.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Chemikálie

Oligodeoxynukleotidy: ODN: 5'-GGGTACGCTCTTCAAAAGAAGA CCCTA-
CCCAAAGGGTAGGGCGGGTTGGGA

ODN se nejdříve rozpustily v ACS vodě na 100 μM koncentraci (106 μl) a z ní se ředěním s ACS vodou připravila 60 μM koncentrace (40 μl). Poté se ODN naředily 1:1 s 20 mM Tris acetátovým pufrům, pH 7 a byly připraveny v koncentraci 30 μM v 10 mM Tris-acetátového pufru pH 7.0

- 1) Pufr na ODN: 25 ml 20 mM Tris acetátového pufru, pH 7 se připravilo naředěním 25 mM Tris acetátového pufru ACS vodou 40 ml 25 mM Tris HAc pufru + 10 ml ACS vody
- 2) Pracovní pufr: 500 ml naváží se 0.604 g Trisu, 0.2454 g octanu draselného, rozpustí v ACS vodě, přidá se 1 ml Tritonu X-100 a pH se upraví kyselinou octovou na 7.0
- 3) Zásobní roztok heminu (31.25 mM): naváží se 0.02547 g heminu a rozpustí v 1.25 ml DMSO a dále naředí na koncentraci 312.5 μM pracovním pufrům (100 μl zásobního roztoku + 9 900 μl pracovního pufru)
- 4) Zásobní roztok ABTS(32 mM): naváží se 0.1647 g ABTS a rozpustí v 10ml pracovního pufru.
- 5) Zásobní roztok H_2O_2 (20 mM): napipetují se 3 μl 30 % peroxidu vodíku a 997 μl pracovního pufru



Obr.1: Chemikálie na přípravu G-kvadruplexů

Pracovní postup

2 μl DNA ODN sondy (30 μM) bylo přidáno do 100 μl pracovního pufru (Obr.2) a směs se inkubovala 5 minut při 95°C, aby se odstranili agregáty (Obr.3).



Obr.2: Napipetování DNA ODN sondy do pracovního pufru



Obr. 3: Inkubace ODN 5 minut při 95°C v termomixeru.

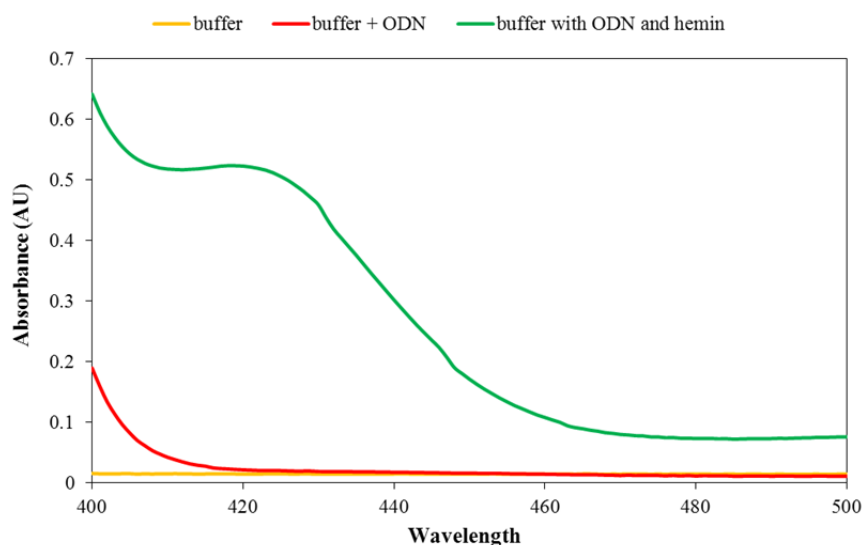
Poté byl roztok pomalu schlazen na 25°C a dále inkubován při 25°C 20 minut. Dále bylo k němu přidáno 2 μL heminového roztoku a směs byla inkubována 60 minut při 25°C. Dále bylo přidáno 20 μL ABTS a 22 μL H_2O_2 a 54 μL pracovního pufru přičemž výslední objem byl 200 μL . Po pěti minutách se vytvořil G-kvadruplex zelené barvy (Obr.4) změřilo VIS spektrum na spektrofotometru Specord 210 při pokojové teplotě (obr.5).



Obr.4: G-kvadruplex s heminem vytváří DNAzym s peroxidázovou aktivitou, která způsobuje, že se peroxid vodíku redukuje na vodu a oxiduje ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina, bezbarevný roztok) na ABTS^{•+} radikál (roztok zelené barvy), který lze stanovit spektrofotometricky s absorpčním maximem při 420 nm (Obr.5-6).



Obr.5: Měření VIS spektra G-kvadruplexu vytvořeného v přítomnosti draselných iontů a heminu s ABTS a peroxidem vodíku na spektrofotometru Specord 210



Obr.6: Záznam měření spektra vytvořeného G-kvadruplexu (zelený absorpční signál s absorpčním maximem při 420 nm)

Literatura:

Zhou, X.-H., D.-M. Kong, and H.-X. Shen, G-quadruplex-hemin DNAzyme-amplified colorimetric detection of Ag⁺ ion. *Analytica Chimica Acta*, 2010. 678(1): p. 124-127.

CZ.1.07/2.4.00/31.0023 NanoBioMetalNet
Partnerská síť centra excelentního
bionanotechnologického výzkumu
http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ