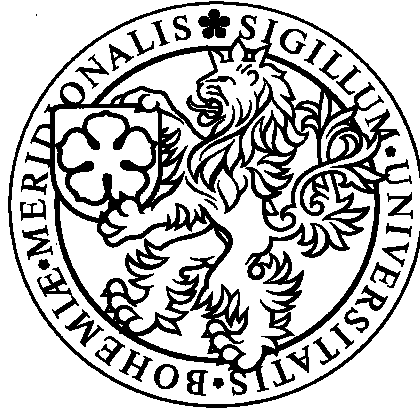


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Příprava izotopicky značených jednořetězcových DNA oligonukleotidů
pro NMR spektroskopii

Bakalářská práce 2008

Vypracoval: Jaromír Cihlář
Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Trantírek PhD

Cihlář J, 2008: Příprava izotopicky značených jednořetězcových DNA oligonukleotidů pro NMR spektroskopii [Preparation of isotopic-labeled single-strand DNA oligonucleotides for NMR spectroscopy . Bc. Thesis, in Czech] – 40 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

We have established a cost efficient approach for isotopic labeling of single-strand DNA oligonucleotides. The method is based on cultivation of bacteria containing plasmid with squence of interest in isotop-labeled M9 minimal medium.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a rad školitele.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 17.1.2008

.....
Jaromír Cihlář

Poděkování:

Na tomto místě bych rád vyjádřil své upřímné poděkování především Lukášovi a Silvě, ale i všem ostatním členům Laboratoře strukturní biologie.

Mé velké díky patří rodičům.

Obsah

1. ÚVOD	5
1.1 DNA	5
1.1.1 A-DNA	6
1.1.2 B-DNA	6
1.1.4 DALŠÍ NESTANDARDNÍ STRUKTURY DNA	7
1.2 METODY STUDIA NUKLEOVÝCH KYSELIN	9
1.3 CÍLE PRÁCE	11
2. METODY	12
2.1 METODY PŘÍPRAVY VZORKU ZNAČENÉ DNA	12
2.1.1 CHEMICKÁ SYNTÉZA	12
2.1.2 ENZYMATICKÁ SYNTÉZA	13
2.1.3 <i>IN VIVO</i> SYNTÉZA	14
2.1.4 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU DNA	14
2.1.4.1 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU DNA MULTIPLIKACÍ CÍLOVÉ SEKVENCE	15
2.1.4.2 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU PLASMIDOVÉ DNA	16
2.2 PŘÍPRAVA IZOTOPICKY ZNAČENÉHO ssDNA OLIGONUKLEOTIDU	16
2.2.1 POUŽITÉ OLIGONUKLEOTIDY	17
2.2.2 ANEALING	17
2.2.3 LIGACE	17
2.2.4 TRANSFORMACE BAKTERIÍ METODOU HEAT-SHOCK	18
2.2.5 IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA	18
2.2.5.1 IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA METODOU ALKALICKÉ LÝZE	18
2.2.6 IZOLACE CÍLOVÉ SEKVENCE	19
2.2.6.1 RESTRIKČNÍ REAKCE ENZYMY SetI A CviKI-1	19
2.2.6.2 IZOLACE CÍLOVÉ SEKVENCE	19
2.3 OPTIMALIZACE PROUKCE KONEČNÉHO PRODUKTU	19
2.3.1 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU PLASMIDOVÉ DNA	19
2.3.2 PŘÍPRAVA INZERTU LIGAČNÍ METODOU	21
2.3.2.3 PŘÍPRAVA INZERTU METODOU ESRA	22
2.4 ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU	23
2.5 ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU	23
2.5.1 PŘÍPRAVA GELU	23
2.5.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ	23
2.5.3 VLASTNÍ ELEKTROFORÉZA A BARVENÍ GELU	23
2.6. IZOLACE DNA Z GELU METODOU FREEZE-SQUEEZE	24
2.7 STANOVENÍ KONCENTRACE DNA	24
2.8 SEKVENACE INZERTU	25
3. MATERIÁL	26
3.1. ORGANISMY	26
3.2 VEKORY	26
3.3 MÉDIA	26
3.4 ROZTOKY A PUFRY	27
3.5 OSTATNÍ CHEMIKÁLIE	28
4. VÝSLEDKY	29
4.1. PŘÍPRAVA IZOTOPICKY ZNAČENÉHO DNA OLIGONUKLEOTIDU	29

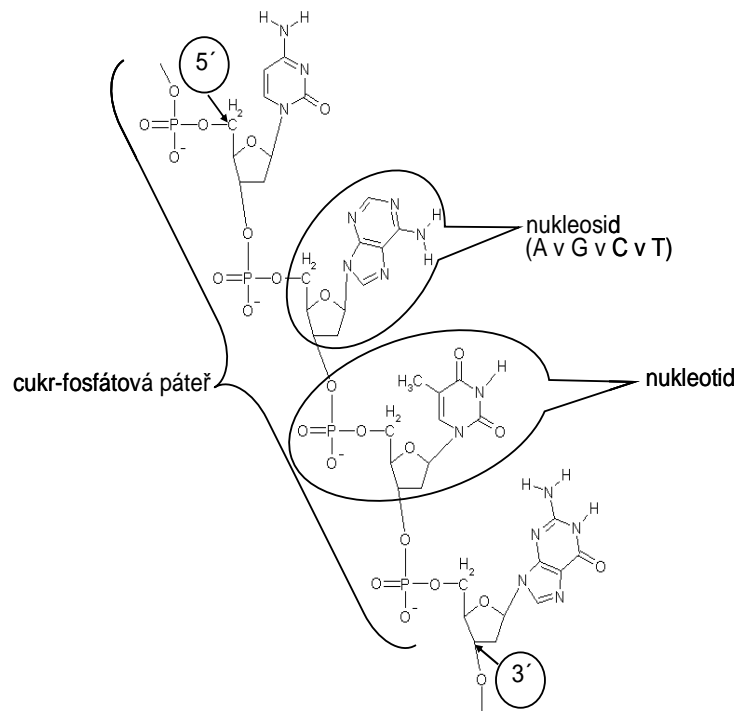
4.2 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU PLASM. DNA INDUKCÍ CHLORAMPHENICOLEM	31
4.3 MULTIPLIKACE CÍLOVÉ SEKVENCE.....	33
4.3.1 PŘÍPRAVA INZERTU LIGAČNÍ METODOU	33
4.3.2 MULTIPLIKACE CÍLOVÉ SEKVENCE METODOU ESRA	34
5. DISKUZE.....	36
6. ZÁVĚR	38
7. LITERATURA.....	39

1. ÚVOD

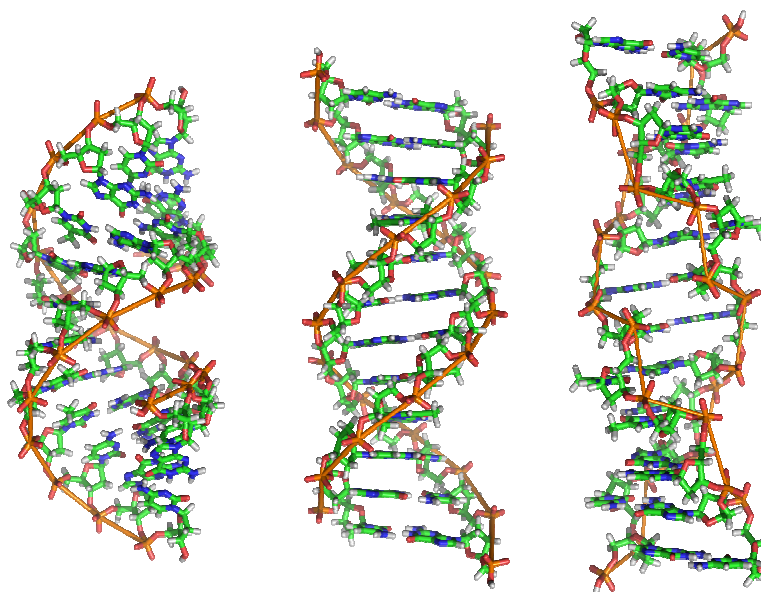
1.1 DNA

DNA (DeoxyriboNukleicAcid) je lineární polymer nukleotidů, sloučenin, vznikajících spojením jedné ze čtyř heterocyklických dusíkatých bází (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin), cukru deoxyribózy a fosfátu. Nukleotidy jsou spojeny 3'-5' fosfodiesterickou vazbou. Polymer DNA je orientovaný a má 5' fosfátový konec a 3' hydroxylový konec (viz obr 1.1).

V buňkách živých organismů se DNA vyskytuje převážně ve formě dvoušroubovice, která je tvořena dvěma antiparalelními řetězci DNA, což znamená, že jeden řetězec jde ve směru 5' -> 3' a druhý ve směru 3' -> 5'. Řetězce jsou navzájem spojeny vodíkovými vazbami mezi jednotlivými bázemi (AT a GC). Toto párování bází zajišťuje značnou stabilitu dvoušroubovice DNA. Hydrofilní deoxyribóza a fosfátové skupiny jsou na vnější straně šroubovice a tvoří její kostru, zatímco svojí podstatou hydrofilní báze se nacházejí v rovinách kolmých na helikální osu a jsou schované uvnitř struktury dvoušroubovice. Rozdíly v konformaci cukr-fosfátové páteře a v orientaci báze vůči cukru, vedou k rozdílům v lokální struktuře DNA. Sekvence nukleotidů určují jakou konformaci bude DNA zaujímat. Nejčastějšími typy DNA jsou A, B a Z dvoušroubovice (viz obr. 1.2).



Obr. 1.1 Struktura jednořetězcové DNA



Obr. 1.2 z leva: A-, B-, Z- forma dna

1.1.1 A-DNA

A-DNA je pravotočivá dvoušroubovice, která byla identifikována v roztocích s nižší relativní vlhkostí (75%). Od B – formy se na první pohled liší tvarem žlábků. Malý je poněkud mělčí, velký naopak velmi hluboký. Její průměr je 2,3 nm, výška jednoho patra přibližně 2,5 nm a na jednu otáčku připadá jedenáct pater. A-DNA je více stabilní v oblastech DNA se sekvencemi d(CC).d(GG) (Mazur et al., 1989; Floppe & MacKerell, 1999), zatímco sekvence d(AA).d(TT) nejsou ochotné izomerizovat do A-DNA (Pilet et al., 1975; Becker & Wang, 1989). Navzdory podmínkám, při kterých byla její struktura zjištěna, je tato dehydrovaná forma DNA biologicky relevantní, protože je záměrně vyvolávána působením polymeráz (Florentiev & Ivanov, 1970; Beabealashvily et al., 1971; Eom et al., 1996) a dalších proteinů (Ivanov et al., 1995; Jones et al., 1999) a nachází se v hybridech DNA:RNA.

1.1.2 B-DNA

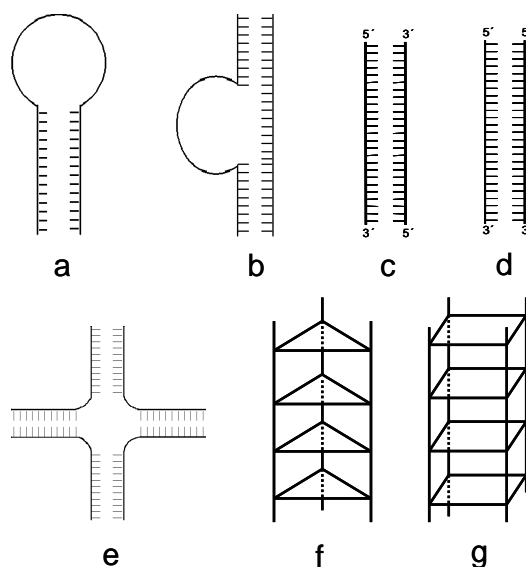
B-DNA je nejběžnější a s největší pravděpodobností biologicky relevantní formou DNA v buňkách živočichů. B-DNA je pravotočivá dvoušroubovice s průměrem 2 nm a výškou jednoho patra 3,4 nm. Každý následující pár bazí je, vzhledem k předchozímu, pootočen o 36°, takže deset pater tvoří jednu úplnou otáčku. Dominující vlastností B-DNA je přítomnost dvou typů žlábků: velký (major groove, 1,2 nm) a malý (minor groove, 0,6 nm).

1.1.3 Z-DNA

Z-DNA se nejčastěji vyskytuje v rámci sekvencí obsahujících střídající se purin-pyrimidinové zbytky za přítomnosti vysoké koncentrace pozitivně nabitých iontů (Wang et al., 1981; Dickerson et al., 1982). Na rozdíl od předešlých dvou je tato dvoušroubovice levotočivá a má jen jeden žlábek. Její průměr je 1,8 nm, výška jednoho patra přibližně 4,6 nm, na jednu otáčku připadá 12 pater. Existence Z-DNA *in-vivo* byla prokázána objevením protilátek, které rozpoznávají různé strukturní prvky Z-DNA šroubovice a vážou se na $(GC)_n$ oblasti DNA (Nordheim et al., 1982), ale teprve nedávno byly objeveny enzymy které mohou specificky rozpoznávat struktury tvořené touto levotočivou šroubovicí (Brown et al., 2000). Schopnost DNA přijímat „*non-Watson-Crickovské*“ struktury má vliv na kontrolu stupně superspiralizace DNA (Peck et al., 1982; Sigleton et al. 1982), na procesy genové exprese i na genetickou rekombinaci.

1.1.4 DALŠÍ NESTANDARDNÍ STRUKTURY DNA

Kromě obvyklých duplexových struktur s opakujícím se G-C a A-T párováním, existuje několik sekundárních a terciálních strukturních motivů, které hrají důležitou roli v procesech rekombinace, replikace a částečně i regulace genové exprese (Synden, 1994). Mnoho sekvencí jednořetězcové i dvouřetězcové DNA má potenciál zaujímat velmi rozmanité duplexové, vlásenkové a jiné motivy, které vznikají důsledkem vlivu sekvence DNA na vlastní sekundární strukturu (viz obr. 1.3).



Obr. 1.3 přehled DNA motivů: a- ss vlásenka, b- smyčka, c- antiparalelní ds DNA, d- paralelní ds DNA, e- Hollidayovy struktury, f- triplex, g- kvadruplex

Mezi nejčastější nestandardní struktury patří:

DNA palindromy - pokud jsou dvě sekvence v rámci jednoho řetězce navzájem komplementární, vznikají palindromy. Jednořetězcové DNA mohou tvořit různé typy vlásenek, nebo pseudosmyček, které hrají důležitou roli při terminaci transkripce u prokaryot (Chou et al., 2003).

Paralelní dsDNA - specifické, na A-T bohaté, sekvence DNA se mohou párovat tak, že formují paralelní dvoušroubovité struktury. Tyto struktury jsou fyzikálně velmi podobné B-DNA, ale nejsou vhodným substrátem pro většinu enzymů (Synden, 1994).

Aptamery – syntetické jednořetězcové oligonukleotidy o délce několika desítek nukleotidů, vykazující značnou afinitu a specifitu vůči různým cílům. Aptamery mají vysoce uspořádanou terciární strukturu, která jim umožňuje formovat velmi stabilní komplexy s různými typy molekul proteinů a nukleových kyselin (Chou et al., 2003). Proto jsou považovány za potencionální terapeuticky aktivní látky. Příkladem může být rodina aptamerů schopných inhibovat tvorbu trombů tím, že tvoří stabilní komplexy s trombinem (Spiridonova & Kopylov, 2001).

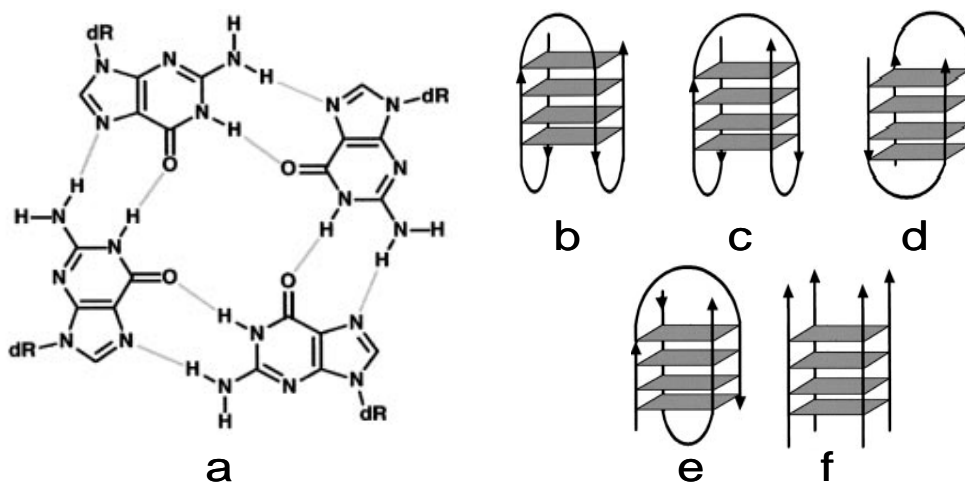
Hollidayovy struktury - struktury vznikající spojením dvou téměř identických DNA dvoušroubovic vzájemnou výměnou řetězců. Tyto struktury jsou nezbytné pro homologní rekombinaci genetické informace, ale i pro opravy dvouřetězcových zlomů DNA a replikační vidličky (Synden, 1994).

DNA triplexy - tyto struktury se obecně tvoří v oblastech se specifickou sekvencí. Polypurin-polypirimidinové sekvence se zrcadlovým opakováním mohou tvořit intramolekulární tercierní struktury (tzv. H-DNA). Hlavní typ tercierních struktur se skládá z tripletů C*G-C a T*A-T formujících Pyr*Pur-Pyr¹ triplexy. Třetí řetězec se vodíkovými vazbami váže do velkého žlábků standardního DNA duplexu. Tyto struktury jsou odpovědné například za regulaci transkripce u eukaryot, nebo za superspiralizaci plasmidové DNA (Shindo et al., 1997).

DNA kvadruplexy - DNA šroubovice obsahující specifické na G bohaté sekvence se mohou navzájem vázat vodíkovými vazbami a tvořit stabilní kvarterní struktury (viz obr. 1.4). Byly prokázány in-vitro (Henderson et al., 1987; Patel et al., 1999) a nedávno také in-vivo, díky enzymům, které se specificky vážou na tyto sekvence, aby umožnily jejich štěpení (Sun et al., 2001), nebo rozvinutí (Sun et al.,

¹ Pyr* označuje třetí řetězec

1998; Lin et al., 2001). Takové struktury byly identifikovány v koncových oblastech chromozomů – telomerách. Telomery jsou nekódující, vysoce repetitivní sekvence, které poskytují ochranu před zkracováním genomu při buněčném dělení, před nehomologním párováním chromozomů v koncových oblastech chromozomů a před účinkem nukleáz (Ambruz et al., 2006).



Obr. 1.4 a- schéma G – kvarterní struktury, b- monomerní „židle“, c- monomerní „koš“, c- dimerní „židle“, e- dimerní „koš“, f- tetramer

1.2 METODY STUDIA NUKLEOVÝCH KYSELIN

Ze všech současně dostupných technik pro určování struktur biologických makromolekul na atomární úrovni jsou pro studium nukleových kyselin nejpoužívanější NMR (Nuclear Magnetic Resonance) a rentgenová krystalografie.

Rentgenová krystalografie využívá rentgenové difrakce, jevu, při kterém jsou rentgenové paprsky rozptýleny od elektronů uvnitř 3D krystalu. Rentgenová krystalografie poskytuje informace o rozložení elektronů v molekule. Jelikož se elektrony vyskytují kolem jádra ve formě elektronových mračen, je možné pomocí této metody určit polohu jader v molekule. Rentgenová krystalografie vyžaduje vysokou čistotu vzorku (>95%), který je následně převeden do formy 3D krystalu². Ten je ovšem náchylný k poškození radiací. Aby se toto poškození eliminovalo, musí být krystal rychle zmražen a udržován při kryogenických teplotách (Brügner, 1992). Struktura nukleových kyselin je studována v pevné fázi za nízké hydratace a často s příměsí aditiv, nezbytných pro růst krystalu. Jelikož jsou nukleové kyseliny velmi citlivé na změny v okolním prostředí, a bereme-li v úvahu podmínky, za nichž se

² Krystal je symetrické tří – dimenzionální periodické seskupení studované molekuly, které je tvořeno opakováním jedné základní jednotky napříč celým krystalem.

informace o molekule získávají, lze předpokládat, že zjištěná struktura nemusí plně odpovídat struktuře molekuly za fyziologických podmínek.

NMR spektroskopie je metoda detekující změny jaderných spinů atomů studované molekuly, které jsou vyvolané působením vnějšího magnetického pole. NMR spektra poskytují informace o topologii, dynamice a 3D struktuře studované molekuly. Oproti rentgenové krystalografii se NMR spektra měří v roztocích, tedy v podmínkách velmi blízkým přirozenému prostředí všech biologických makromolekul. NMR spektroskopie je tedy jedinou dostupnou nedestruktivní metodou pro řešení 3D struktur nukleových kyselin za stavu blízcímu se fyziologickým podmínkám. Ovšem, pro standardní NMR experimenty jsou pufr a teplota vybírány tak, aby optimalizovali rozpustnost a spektrální překryv a minimalizovali počet protonů molekul pufru, které by mohli zastříť rezonance protonů studované molekuly. Následně se mohou vlastnosti použitého pufru podstatně lišit od přirozeného prostředí makromolekul (Serber & Dötsch, 2001). Tento problém se snaží řešit in-cell NMR spektroskopie tím, že biologické makromolekuly zkoumá přímo uvnitř jejich přirozeného prostředí, tedy v živých buňkách.

In-cell NMR spektroskopie využívá citlivosti chemického posunu oproti změnám v prostředí k získání informací o stavu makromolekuly. Změny v prostředí způsobené konformačními změnami, nebo interakcí s ostatními buněčnými komponenty, vedou ke změnám v rezonančních frekvencích jádra, které mohou být detekovány (Reckel et al. 2005). Ranné experimenty byly zaměřeny na malé molekuly, které mohou být od ostatních molekul v buňce odlišeny buď proto, že jsou v buňce nejvíce zastoupeny, nebo proto, že jsou izotopicky značeny. Pomocí In-cell NMR lze studovat i výrazně větší molekuly.

Hlavní přínos In-cell NMR spektroskopie nespočívá v získávání nových struktur, nýbrž v odhalování změn struktury biologických makromolekul, způsobených jejich vazebnými interakcemi s ostatními buněčnými komponenty. Důležitá je možnost porovnání NMR spekter naměřených v buňce se stávajícími in vitro strukturami a ověření jejich biologické relevantnosti. Dosavadní experimenty zaměřené na proteiny ukazují, že tato metoda má své opodstatnění. Bylo například zjištěno, že bakteriální protein FlgM, který je in vitro úplně rozbalený, je v cytoplasmě E.coli částečně zabalen (Dedmon et al., 2002). Na různé odlišnosti oproti in vitro experimentům poukazují i experimenty s bakteriálním proteinem CheY (Hubbard et al., 2003), či kalmodulinem (Serber & Dötsch, 2001).

Pro in-cell NMR spektroskopii proteinů se v současné době nejvíce využívají živé buňky *E.coli* (Serber & Dötsch, 2001), nebo oocyty žáby *Xenopus laevis* (Sakai et al., 2006). Při použití buněk *E.coli* probíhá izotopické značení proteinu přímo v buňce během jeho exprese, při níž jsou do něj inkorporovány izotopicky značené aminokyseliny obsažené v médiu. Žabí oocyty jsou nejčastěji injikovány předem připravenou izotopicky značenou makromolekulou, proto se zdají být vhodnějším prostředkem pro měření in-cell NMR spekter nukleových kyselin. Oproti buňkám *E.coli* navíc odpadá problém s výživou buněk uvnitř NMR kyvety během měření, neboť buňka využívá vlastních zásob živin.

1.3 CÍLE PRÁCE

- A) porovnání dostupných metod pro přípravu izotopicky značených DNA oligonukleotidů – rešerše
- B) příprava izotopicky značeného jednořetězcového DNA oligonukleotidu pro strukturní analýzu NMR spektroskopii

2. METODY

A) rešeršní část

2.1 METODY PŘÍPRAVY VZORKU ZNAČENÉ DNA

Jak už bylo řečeno, aby bylo možné odlišit studovanou molekulu od ostatních molekul v buňce, musí být uniformě izotopicky značena. Úspěšné pokusy a množství experimentů s NMR spektroskopií proteinů jsou v kontrastu s nepatrným využitím této metody pro studium DNA (viz obr. 2.1). Hlavní překážkou je cena izotopicky značených vzorků DNA. Proto je nutné optimalizovat metody přípravy izotopicky značených oligonukleotidů tak, aby byl dosažen akceptovatelný poměr mezi technologickou proveditelností a finanční únosností takové metody. V dnešní době existuje několik metod použitelných pro tento účel.

		Molecule Type				
		Proteins	Nucleic Acids	Protein/NA Complexes	Other	Total
Exp. Method	X-ray	<u>38181</u>	<u>1015</u>	<u>1762</u>	<u>25</u>	<u>40983</u>
	NMR	<u>6053</u>	<u>800</u>	<u>137</u>	<u>7</u>	<u>6997</u>
	Electron Microscopy	<u>110</u>	<u>11</u>	<u>40</u>	<u>0</u>	<u>161</u>
	Other	<u>84</u>	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>94</u>
	Total	<u>44428</u>	<u>1830</u>	<u>1943</u>	<u>34</u>	<u>48235</u>

Obr. 2.1 tabulka shrnující využití dostupných metod pro studium struktur biologických makromolekul (tabulka převzatá z <http://www.pdb.org/>)

2.1.1 CHEMICKÁ SYNTÉZA

Výhodou této metody je flexibilita izotopického značení DNA. Její využití je ale limitováno nutností použít drahé značené chemikálie a komplexností samotné syntézy (Ono et al., 1995; Fernandez et al., 1998; Tjandra et al., 2000; Kojima et al., 2001). Princip metody spočívá v syntéze DNA oligonucleotidu na pevném nosiči, kterým nejčastěji bývá silikagel s různými navázanými polárními a nepolárními skupinami, které posouvají reakční centrum dále od povrchu nosiče. Syntéza probíhá ve směru 3'-5' z nukleosid 3'-fosformidátů - modifikovaných nukleosidů - s navázanými skupinami blokuujícími všechny reaktivní skupiny (Vodrážka & Krechl, 1991). Vzhledem k finanční náročnosti se tato metoda komerčně prakticky

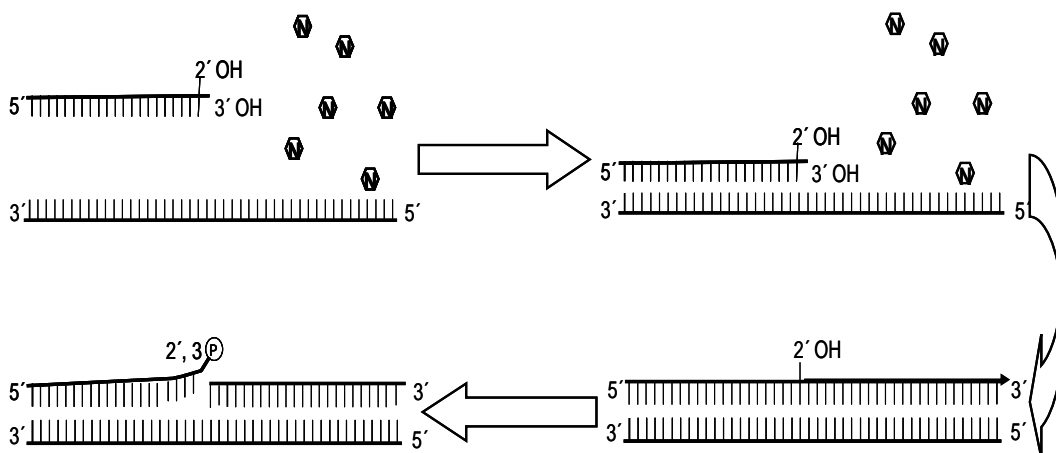
nepoužívá. Ceny 1 mM ^{13}C , ^{15}N izotopicky značeného NMR vzorku DNA pro potřeby NMR spektroskopie se v současné době pohybují mezi 200-300 tisíci Kč.

2.1.2 ENZYMATICKÁ SYNTÉZA

Principem této metody je dosazování izotopicky značených nukleotidů DNA polymerázami za primer připojený k templátové sekvenci. Je to velmi vhodná metoda přípravy izotopicky značených jednořetězcových DNA oligonukleotidů. První publikovaný protokol pro enzymatickou produkci uniformě značených DNA oligonukleotidů využíval Klenow fragmentu DNA polymerázy 1 k syntéze DNA na templátové DNA s kovalentně připojeným primerem (hairpin primer-template) (Zimmer & Crothers, 1995). Primer je zakončený ribonukleotidem, který je hydrolyticky odštěpitelný a umožňuje oddělit cílovou sekvenci od zbytku primeru. Takto modifikovaný primer ovšem výrazně navyšuje cenu syntézy. Syntéza probíhá tak, že primer nasedá na templátovou sekvenci a DNA polymeráza dosazuje izotopicky značené dNTPs (viz obr.2.2). Tato syntéza není amplifikační, tzn. nedochází k exponenciálnímu nárůstu produktu jako při standardní PCR reakci a množství produktu je závislé na množství dodaných komponent (poměr primer:templát = 1:1). Protokol byl upraven za využití Taq DNA polymerázy, která má vyšší úspěšnost inkorporace značených nukleotidů než DNA polymeráza 1 (Masse et al., 1998).

Vhodnou alternativou pro přípravu dvouřetězcových DNA oligonukleotidů je metoda využívající amplifikace cílové sekvence standardní PCR (Polymerase Chain Reaction), která probíhá v reakční směsi obsahující izotopicky značené dNTPs (Louis et al., 1998, Chen et al., 1998; René et al., 2006).

Obě výše uvedené metody nejsou technologicky náročné. Problém spočívá v nutnosti použít drahé izotopicky značené dNTPs. Tuto částku dále navyšuje nákladná modifikace primeru RNA nukleotidem a nevelká efektivnost enzymatické reakce využívající DNA polymeráz. Ceny 1 mM NMR vzorku připraveného enzymatickou metodou se pohybují mezi 80-150 tisíci Kč.



Obr. 2.2 schéma enzymatické přípravy izotopicky značeného oligonukleotidu ukazuje nasedání primerů, polymerizaci ^{13}C , ^{15}N značených dNTP a odštěpení primeru alkalickou hydrolyzou

2.1.3 *IN VIVO* SYNTÉZA

Jako nejoptimálnější se dnes jeví metoda syntézy izotopicky uniformě značených dsDNA oligonukleotidů v bakteriích pěstovaných na M9 (minimálním) médiu obsahujícím izotopicky značený zdroj uhlíku a dusíku (nejčastěji glukóza a NH_4Cl) (Louis et al., 1997; Ramanathan et al., 2002). Tato metoda spočívá v přípravě rekombinantního plasmidu, který obsahuje zvolenou sekvenci. Tímto plasmidem se transformují bakterie pěstované v izotopicky značeném M9 médiu. Z vyizolované plasmidové DNA pak lze běžnými metodami (restrikce enzymy) získat hotový, izotopicky uniformě značený, DNA oligonukleotid. Další nezanedbatelnou výhodou této metody je flexibilita značení DNA, již lze dosáhnout použitím glukózy s ^{13}C v různých polohách molekuly. V současné době existuje několik postupů založených na *in vivo* syntéze, lišících se způsobem přípravy vzorku. *Všechny postupy však byly vyvinuty pro přípravu dsDNA oligonukleotidů.* Ceny 1 mM NMR vzorku, připraveného *in vivo* syntézou se pohybují mezi 15 až 90 tisíci Kč.

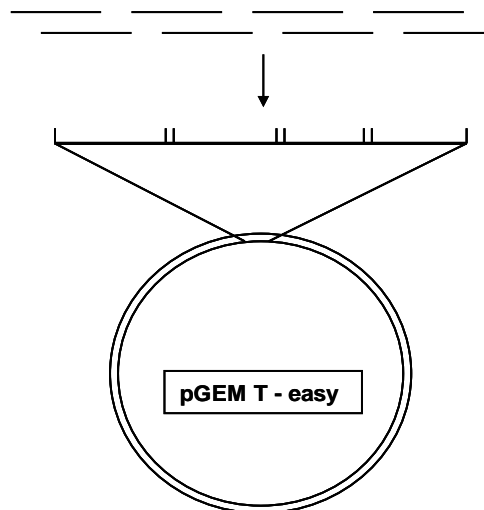
2.1.4 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU DNA

Ve výše popsané metodě je množství získané DNA závislé na množství vyizolované plasmidové DNA, které s jistou pravděpodobností souvisí s množstvím použitého M9 minimálního média. Kritickým faktorem je tedy cena použitého M9 média. V zájmu finančních úspor je proto vhodné optimalizovat výtěžek DNA tak, aby bylo možné použít co nejmenší množství M9 média.

2.1.4.1 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU DNA MULTIPLIKACÍ CÍLOVÉ SEKVENCE

Spočívá ve zvýšení počtu kopií zvolené sekvence v jedné kopii plasmidu. Toho lze dosáhnout dvěma způsoby.

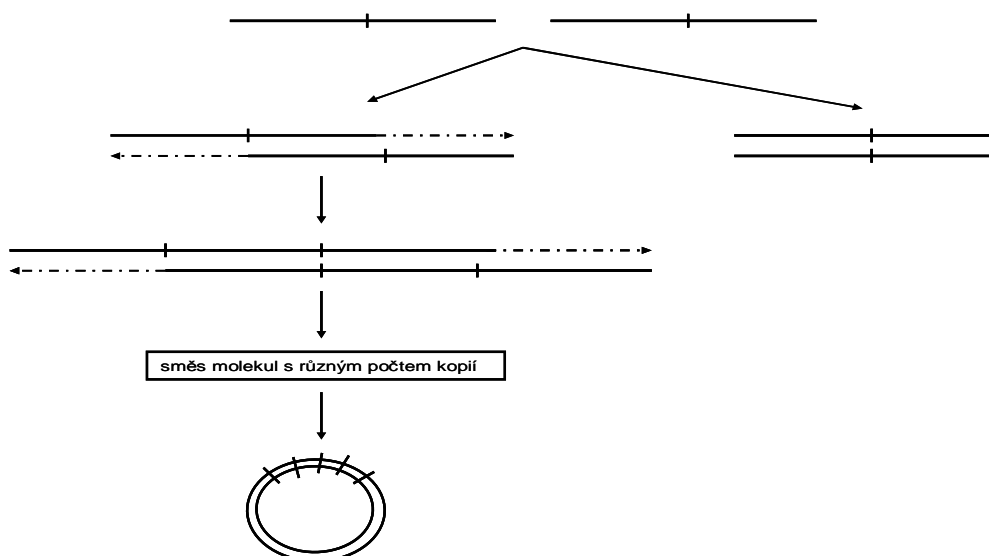
- a) **mnohonásobnou ligací cílové sekvence** (Louis et al., 1997) – za cílové sekvence jsou přidány AATT převisy, jimiž se k sobě navzájem lepí (viz obr. 2.3)



Obr. 2.3 schéma multiplikace cílové sekvence pomocí ligace

- b) **metodou ESRA³** (Louis et al., 1997; Ramanathan et al., 2001) při této metodě jsou oligonukleotidy, obsahující dvě kopie cílové sekvence oddělené restričními místy, vystaveny PCR amplifikaci. Během každého cyklu denaturace a následného anealingu se mohou tyto oligonukleotidy spojit i způsobem vedoucím k 5' převisům, které jsou následně zaplněny DNA polymerázou. Výsledkem takové reakce je populace molekul s rozdílnou délkou řetězce danou různým počtem opakování cílové sekvence (viz obr. 2.4).

³ Endonuclease Sensitive Repeat Amplification



Obr. 2.4 schéma multiplikace cílové sekvence metodou ESRA

2.1.4.2 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU PLASMIDOVÉ DNA

Jelikož bakteriální buňky nerostou v minimálním M9 médiu stejně dobře jako ve standardních médiích, je třeba pečlivě optimalizovat jejich růst. Přidání chloramphenicolu do média způsobí inhibici replikace genomické DNA, což vede ke zvýšení počtu kopií plasmidu v buňce (Sambrook et al., 1982; Ramanathan et al., 2002). Inhibice replikace genomické DNA je způsobena inhibicí proteosyntézy. Jelikož plasmidy využívají replikační faktory s delším poločasem rozpadu, které byly buňkou vyrobeny před přidáním chloramphenicolu, replikují se na úkor genomické DNA.

B) Experimentální část

2.2 PŘÍPRAVA IZOTOPICKY ZNAČENÉHO ssDNA OLIGONUKLEOTIDU

22bp dlouhý ssDNA oligonukleotid se sekvencí odpovídající lidské telomerické DNA ($d[AGGG(TTAGGG)_3]$) tvoří - podle NMR spekter získaných *in vitro* v roztocích s obsahem K^+ iontů - intramolekulární kvadruplex (Ambruz et al., 2006; Burge et al., 2006). Naším cílem byla příprava tohoto ssDNA oligonukleotidu v izotopicky značené podobě pro možné ověření jeho konformace za *in vivo* podmínek pomocí in-cell NMR.

Pro přípravu izotopicky značeného ssDNA oligonukleotidu byla použita upravená metoda syntézy *in vivo* (viz 2.1.3). Cílem tohoto experimentu byla příprava rekombinantního plasmidu (pGEM T-easy) obsahující inzerť se sekvencí požadovaného ssDNA oligonukleotidu. Takto připraveným plasmidem byly

transformovány bakterie E.coli (BL21) pěstované v izotopicky značeném médiu. V další fázi experimentu byl ze získané plasmidové DNA izolován hotový izotopicky značený produkt. Pro izolaci byly vybrány restriční enzymy, které na 5'-3' a 3'-5' řetězcích DNA tvoří různě dlouhé převisy. Vzniklý dsDNA oligonukleotid s různě dlouhými 5'-3' a 3'-5' řetězci lze rozdělit elektroforézou v denaturačním polyakrylamidovém (PAGE) gelu.

2.2.1 POUŽITÉ OLIGONUKLEOTIDY

Použité oligonukleotidy byly objednány u firmy Sigma Aldrich.

Pro účel izolace cílové sekvence byla do inzertu začleněna restriční místa pro Enzymy SetI (ASST⁺) a CviKI-1 (RG⁺CY). Enzym SetI tvoří na 3'->5' řetězci čtyř bazový převis, enzym CviKI-1 (RG⁺CY) tvoří tupé konce (viz 2.2).

FW sekvence:

5'- GGA TCA CGT AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG GCC A -3'

RV sekvence:

5'- GGC CCT AAC CCT AAC CCT AAC CCT ACG TGA TCC A -3'

Vlastní cílová sekvence:

5'- AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G -3' ($\epsilon_{260}=228500 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

2.2.2 ANEALING

Reakce, obsahující 1 μl FW i RV DNA (1,2 μg / ml) + destilovanou vodu do celkového objemu 20 μl , proběhla na přístroji MiniCyclerTM (MJ Research) za těchto podmínek:

denaturace při 95°C 1

pomalé chladnutí na 4°C

2.2.3 LIGACE

Vzniklý (viz 2.2.2) dvouřetězcový produkt s A převisy byl ligován do plasmidu pGEM T-easy.

Ligační směs se skládala z 1 μl inzertové DNA + 1 μl plasmidové DNA + 1 μl T4 DNA ligázy (3U/ μl), 5 μl 2x ligačního pufru + destilovaná voda do celkového objemu 10 μl . Reakce proběhla přes noc při teplotě 4°C.

2.2.4 TRANSFORMACE BAKTERIÍ METODOU HEAT-SHOCK

Ligační směs byla transformována tepelným šokem do kompetentních buněk *E.coli* BL21.

K 50 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 5 μ l legační směsi. Suspenze byla inkubována 30 minut na ledu. Transformace probíhala při 42 $^{\circ}$ C po dobu jedné minuty a byla ukončena rychlým zchlazením na ledu po dobu dvou minut. K transformovaným buňkám bylo přidáno 150 μ l SOC média, směs byla inkubována 45 minut při 37 $^{\circ}$ C, 250 rpm. Narostlé buňky byly vysety na bakteriální půdu obsahující ampicilin a 40 μ l 2% X-galu a umístěny přes noc do termostatu s teplotou 37 $^{\circ}$ C.

2.2.5 IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA

Na základě modro bílé selekce, kterou plasmid pGEM T-easy umožňuje, byly vybrány bílé bakteriální kolonie. Vybrané kolonie byly inokulovány do 4 ml LB média s ampicilem (100 μ g/ml) a inkubovány přes noc ve třepačce při 37 $^{\circ}$ C, 250 rpm. Narostlá kultura byla centrifugována při 14000 rpm (centrifuga Eppendorf MiniSpin plus). Plasmidová DNA byla izolována z peletu metodou alkalické lýze, nebo pomocí soupravy Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed) dle protokolu výrobce.

2.2.5.1 IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA METODOU ALKALICKÉ LÝZE

Pelet byl rozpuštěn v 50 μ l TEG, ke směsi bylo přidáno 100 μ l čerstvě připraveného roztoku 0,2 M NaOH + 1% SDS. Po promíchání bylo dodáno 75 μ l 3M acetátu sodného a 225 μ l 5 M LiCl. Směs byla centrifugována 10 minut při 14000 rpm (centrifuga Eppendorf MiniSpin Plus). Vodní fáze byla přenesena do čisté mikrozkušavky a byla doplněna 900 μ l 96% etanolu (- 20 $^{\circ}$ C). Po 5 minutách na ledu byla znovu centrifugována 15 minut na max. rpm. Po odstranění vodní fáze byl pelet rozpuštěn v 70% ethanolu (- 20 $^{\circ}$ C) a ihned centrifugován 5 minut na max. rpm. Vodní fáze byla slita a její zbytky opatrně odsány. Pelet byl vysušen při 37 $^{\circ}$ C a následně rozpuštěn ve 30 μ l H₂O. Pro ověření sekvence vloženého inzertu byla provedena sekvenace (viz 2.8)

2.2.6 IZOLACE CÍLOVÉ SEKVENCE

Přítomnost inzertu byla ověřena kontrolní restrikcí enzymem EcoRI.

Reakční směs se skládala z 10 µl plasmidové DNA + 2 µl 10x pufru + 2 U restrikčního enzymu + destilované vody do celkového objemu 20 µl. Reakce probíhala při 37 °C po dobu 3 hodin. Výsledek reakce byl vyhodnocen pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (viz 2.4).

2.2.6.1 RESTRIKČNÍ REAKCE ENZYMY SetI A CviKI-1

Reakce byla provedena zvlášť pro enzym SetI a pro enzym CviKI-1, neboť každý z enzymů vyžaduje jiné reakční podmínky.

Při restrikci enzymem SetI se reakční směs skládala z 10 µl plasmidové DNA + 2 µl 10x pufru + 2 U restrikčního enzymu + destilované vody do celkového objemu 20 µl a reakce probíhala při 55 °C po dobu 1 hodiny. Poté byla DNA přesrážena ethanolem a znovu rozpuštěna v 10 µl destilované vody.

Při restrikci enzymem CviKI-1 se reakční směs skládala z 10 µl přesrážené DNA + 2 µl 10x pufru + 2 U restrikčního enzymu + destilované vody do celkového objemu 20 µl. Reakce probíhala při 37 °C po dobu 3 hodin. Poté byla DNA znovu přesrážena ethanolem a rozpuštěna v 10 µl destilované vody. Výsledek reakce byl vyhodnocen pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (viz 2.4), produkty reakce byly z gelu vyříznuty a izolovány (viz 2.6)

2.2.6.2 IZOLACE CÍLOVÉ SEKVENCE

Konečný produkt byl získán elektroforézou v denaturačním PAGE gelu (viz 2.5). Produkt byl z gelu vyříznut a izolován metodou Freeze – squeeze (viz 2.6). Nakonec byla změřena koncentrace cílového ssDNA oligonukleotidu (viz 2.7)

2.3 OPTIMALIZACE PROUKCE KONEČNÉHO PRODUKTU

2.3.1 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU PLASMIDOVÉ DNA

Aby se zvýšila produkce plasmidové DNA v bakteriálních buňkách, které v minimálním M9 médiu rostou hůře než ve standardních médiích, byla provedena indukce chloramphenicolem (viz 2.1.4.2)

Bakterie byly indukovány při třech různých optických denzitách ($OD_{600} = 0,6; 0,9; 1,1$) třemi různými koncentracemi chloramphenicolu (100, 170, 220 µg/ml) tak, aby mohla být stanovena optimální doba indukce a koncentrace chloramphenicolu.

V intervalech 4, 8 a 16 hodin byly odebírány vzorky bakterií po 1 ml. Z odebraných vzorků byla izolována plasmidová DNA (viz 2.2.5) a byla stanovena její koncentrace (viz 2.7). Výsledky byly naneseny do grafů.

2.3.2 MULTIPLIKACE CÍLOVÉ SEKVENCE (viz 2.1.4.1)

2.3.2.1 POUŽITÉ OLIGONUKLEOTIDY

Použité oligonukleotidy byly objednány u firmi Sigma Aldrich.

Pro účely izolace cílové sekvence byla do inzertu začleněna restrikční místa pro enzymy Dral (TTT[✓]AAA) a AclI (AA[✓]CGTT) (restrikce produktu multiplikace ligační metodou) a pro enzymy Dral a AlwI (GGATC(N)₄[✓]) (restrikce produktu multiplikace metodou ESRA). Tato restrikční místa zároveň oddělovala kopie cílové sekvence.

Primery pro multiplikaci ligační metodou (viz obr. 2.5):

HTSins1.1F:

5'- AAT TTA AAG GGT TAG GGT TAG GGT TAG GGA ACG TTG TCG TC -3'

HTSins1.1R:

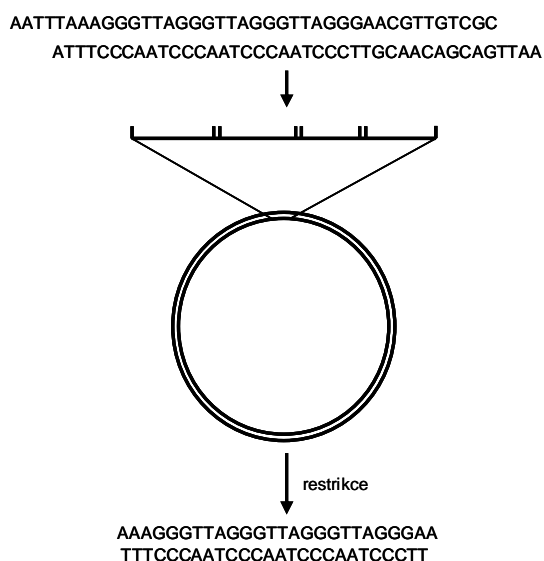
5'- AAT TGA CGA CAA CGT TCC CTA ACC CTA ACC CTA AAC CTT TA -3'

HTSprim1.1F:

5'- TTA AAT TTC CCA ATC CCA AT -3'

HTSprim1.1R:

5'- TTA AGG TTT AGG GTT AGG GA-3'



Obr. 2.5 schéma multiplikace vybrané sekvence ligační metodou

Primery pro multiplikaci metodou ESRA (viz obr. 2.6):

HTSins1.2F:

5'- AAA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG AAC GTT GGA TCC TAG GAA AGG
GTT AGG GTT AGG GTT AGG GAA -3'

HTSins1.2R:

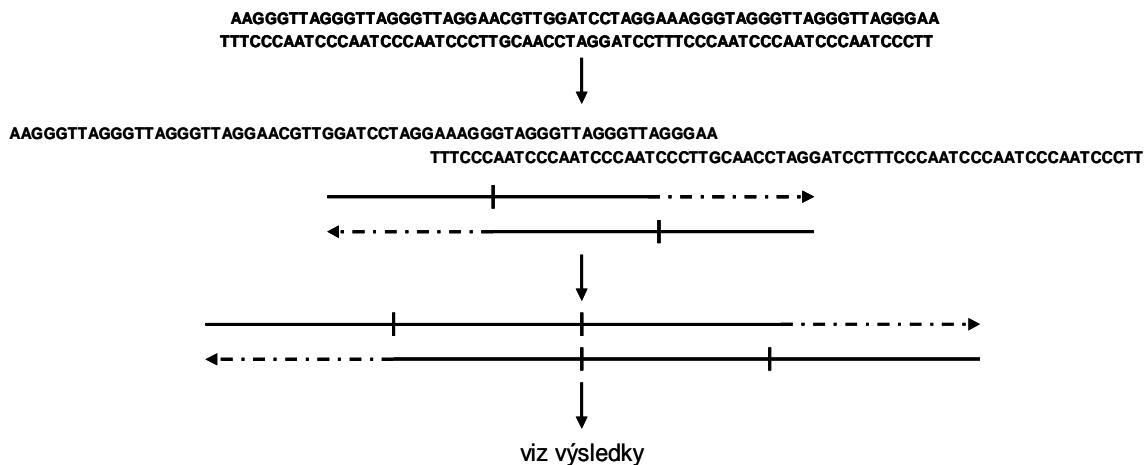
5'- TTC CCT AAC CCT AAC CCT AAC CCT TTC CTA GGA TCC AAC GTT CCC
TAA CCC TAA CCC TAA CCC TTT -3'

HTSprim1.2F:

5'- TTT CCC AAT CCC AAT CCC AA-3'

HTSprim1.2R:

5'-AAA GGG TTA GGG TTA GGG TT -3'



Obr. 2.6 schéma multiplikace vybrané sekvence metodou ESRA

Vlastní cílová sekvence:

5'- AAA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG AA -3' ($\epsilon_{260}=278200 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Tento 26 bp dlouhý ssDNA oligonukleotid, podle zjištěných *in vitro* NMR spekter, mnohem více odpovídá „wild-type“ telomerické sekvenci (Ambrus et al.,2006).

2.3.2.2 PŘÍPRAVA INZERTU LIGAČNÍ METODOU

Aby mohla být provedena ligace, bylo třeba spojit sekvence HTSins1.1F a HTSins1.1R (každá o koncentraci 2 nmol/ μl) do duplexu se čtyřbazovými převisy AATT (viz 2.2.2).

Poté proběhla samotná ligace. Reakce obsahovala 10 µl duplexové DNA + 2 µl ligačního pufru + 2 U T4 DNA ligázy + destilovanou vodu do celkového objemu 20 µl a probíhala při 16 °C po dobu 12 hodin.

Po přesrážení ethanolem byla ligovaná DNA namnožena pomocí PCR. PCR reakce obsahovala 8 µl ligované DNA + 1 µl obou primerů HTSprim1.1F a HTSprim1.1R o koncentraci 10 pM + 10 µl Fussion-Flash master mix. Reakce proběhla na přístroji MiniCycler™ (MJ Research) za těchto podmínek:

- 1) počáteční denaturace 10 sekund při 98 °C
- 2) denaturace 1 sekunda při 98 °C
- 3) nasedání primerů 5 sekund při 68 °C
- 4) elongace 15 sekund při 72 °C
kroky 2 – 4, 35 cyklů
- 5) dosyntetizování nedokončených vláken 60 sekund při 72 °C

Po přesrážení DNA byla provedena ligace do plasmidu pGEM T-easy (viz 2.2.3), transformace bakterií BL21 (viz 2.2.4) a izolace plasmidové DNA (viz 2.2.5). Pro kontrolu přítomnosti inzertu byla provedena restrikce enzymem EcoR1 (viz 2.2.6) a výsledek reakce vizualizován elektroforézou v agarózovém gelu (viz 2.4).

2.3.2.3 PŘÍPRAVA INZERTU METODOU ESRA

Pro multiplikaci metodou ESRA byla provedena PCR reakce skladající se z 5 µl HTSins1.2F a 5 µl HTSins1.1R (2nmol/ µl) + 10 µl Fussion-Flash master mix. (podmínky reakce viz 2.3.2.2). Po proběhnutí reakce byla DNA přesrážena ethanolem.

Pro namnožení řetězců obsahujících více kopií cílové sekvence byla znovu provedena PCR reakce za přítomnosti primerů HTSprim1.2F a HTSprim1.2R. Reakce se skládala z 8 µl přesrážené DNA + 1 µl obou primerů o koncentraci 10 pM + 10 µl Fussion-Flash master mix (podmínky reakce viz 2.3.2.2).

Výsledek PCR reakce byl vizualizován elektroforézou v agarózovém gelu (viz 2.4) a proužek gelu obsahující kopie cílové sekvence byl vyříznut. Po vyzolování DNA z gelu (viz 2.6) byla provedena ligace do plasmidu pGEM T-easy (viz 2.2.3), transformace bakterií BL21 (viz 2.2.4) a izolace plasmidové DNA (viz 2.2.5). Kontrola přítomnosti inzertu byla provedena restrikční reakcí enzymem EcoR1 (viz 2.2.6) a výsledek reakce byl vizualizován elektroforézou v agarózovém gelu.

2.4 ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU

Byla připravena směs agarózy a 1x TAE pufru o výsledné koncentraci 1%. Agaróza byla rozpuštěna zahřátím směsi v mikrovlnné troubě. Po jemném ochlazení směsi pod tekoucí vodou byl přidán Cyber Green (1 μ l/10 ml směsi) a směs byla nalita do elektroforetické formy s hřebenem. Po zatuhnutí byl hřeben vyjmut a gel přelit 1x TAE puftrem. Do vzniklých jamek byly nanášeny vzorky DNA smíchané s DNA nanášecím puftrem (1:1/10). Pro stanovení velikosti byl do jedné jamky nanesen 2-log DNA Ladder. Elektroforéza probíhala při 60-90 V v horizontální elektroforetické vaně. Poté byla DNA vizualizovaná na gelovém fotodokumentačním zařízení MF-chemiBIS (DNR Bio-imaging systems).

2.5 ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU

2.5.1 PŘÍPRAVA GELU

Podle potřeby byl naředěn příslušný zásobní 20% roztok akrylamidu. K němu bylo přidáno 100 μ l 10% APS a 10 μ l TEMED, směs byla okamžitě nalita mezi dvě utěsněná elektroforetická skla a ihned poté byl mezi skla vložen hřeben, tvořící jamky. Po zatuhnutí gelu byl hřeben vyjmut, jamky propláchnuty destilovanou vodou a gel umístěn do připravené vertikální elektroforetické soupravy (Owl; Hoefer). Nakonec byly vany naplněny 1x TBE puftrem a elektroforetická souprava připojena ke zdroji napětí, aby se gel předehtl.

2.5.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Vzorky DNA byly smíchány s formamidovým nanášecím puftrem v poměru 1:1. Poté byla směs inkubována 5 minut při 95 °C a nanášena do jamek na gelu.

2.5.3 VLASTNÍ ELEKTROFORÉZA A BARVENÍ GELU

Elektroforéza probíhala při 140 V až do doby, kdy spodní barvička formamidového nanášecího pufru nedosáhla spodního okraje gelu. Po skončení byl gel opatrně vyjmut ze skel a obarven v 1x TBE puftrem s ethidium bromidem o přibližné koncentraci 0,5 ng/ml. Poté byla DNA vizualizovaná na gelovém fotodokumentačním zařízení MF-chemiBIS (DNR Bio-imaging systems).

2.6. IZOLACE DNA Z GELU METODOU FREEZE-SQUEEZE

Proužek gelu obsahující DNA byl vyříznut, umístěn do mikroskopické mikrozumavky obsahující 1 ml freeze-squeeze pufru a inkubován 30 minut při pokojové teplotě. Mezitím byla připravena střední mikroskopická mikrozumavka s malou dírkou ve dně. Poté byla mikroskopická mikrozumavka asi do svého 1/5 objemu naplněna skelnou vatou (Serwa), vata byla upěchována. Do takto připravené střední mikroskopické mikrozumavky byl přemístěn vyříznutý proužek gelu, mikroskopická mikrozumavka byla uzavřena a izolována parafilmem. Poté byla mikroskopická mikrozumavka vložena na 30 sekund do tekutého dusíku. Po vytažení byl parafilm odstraněn a mikroskopická mikrozumavka byla vložena do větší čisté mikroskopické mikrozumavky. Izolace DNA z gelu proběhla v centrifuze (10000 rpm, 20 minut, centrifuga Eppendorf MiniSpin plus). Po skončení centrifugace byl ke kapalině ve vnější mikroskopické mikrozumavce přidán 96% ethanol, který vysrážel přítomnou DNA, která byla stočena (14000 rpm, 10 minut). Pelet byl rozpuštěn v 70% ethanolu a znovu zcentriugován (14000 rpm, 5 minut). Nakonec byl pelet vysušen a rozpuštěn v destilované vodě.

2.7 STANOVENÍ KONCENTRACE DNA

Koncentrace pasmidové DNA byla stanovena strojově na spektrofotometru Biowave II (WPA), nebo vypočítána z hodnot absorpance DNA při vlnové délce A_{260} ze vztahu:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 50 / l [\text{cm}]$$

kde 50 je extinkční koeficient dsDNA neznámé sekvence a „l“ odpovídá délce kvivety v cm.

Koncentrace ssDNA byla stanovena strojově na spektrofotometru Biowave II (WPA), dle Lambert-Beerova zákona:

$$c [\text{mol/l}] = A_{260} / \epsilon_{260} \cdot l [\text{cm}]$$

Extinkční koeficienty pro jednotlivé sekvence byly predikovány pomocí software „Primer tools“ (Nationale Institute of Standard and Technology).

2.8 SEKVENACE INZERTU

Pro sekvenaci inzertu byly použity primery SP6fw a T7rv nasedající na SP6 a T7 promotory plasmidu pGEM T-easy. Sekvenační reakce byla namíchána Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit(em) (Applied Biosystems) a její složení bylo: 2 µl PET + 6 µl 2,5x sekvenačního pufru + 1 µl primerů (10 pmol) + 700 ng plasmidové DNA + destilovaná voda do 20 µl. Reakce byla provedena na přístroji MiniCycler™ (MJ Research) za těchto podmínek:

- 1) počáteční denaturace 2 minuty při 94 °C
 - 2) denaturace 1 minuta při 94 °C
 - 3) nasedání primerů 1 minuta při 60 °C
 - 4) elongace 4 minuty při 60 °C
- kroky 2-4, 32 cyklů

Vyhodnocení signálů bylo provedeno na přístroji ABI (Perkin Elmer).

3. MATERIÁL

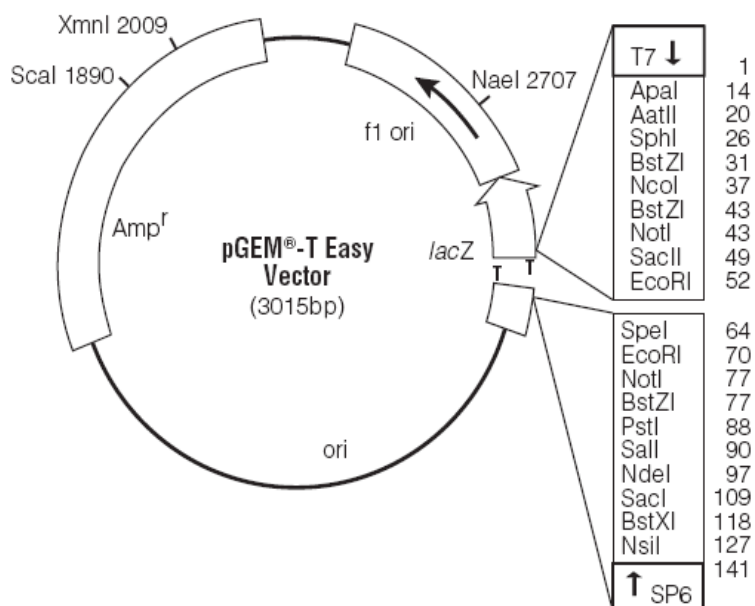
3.1. ORGANISMY

Kompetentní buňky *Escherichia coli* BL21

3.2 VEKORY

pGEM T-easy (viz obr. 3.1) – plasmid pro klonování PCR produktů

- nese rezistenci na ampicilin a lac Z fragment pro tzv. „blue-white“ selekci (Promega)



Obr 3.1 plasmid pGEM T-easy

3.3 MÉDIA

Bakteriální půda:

- 1) 2g Trypton Casein Peptone (Amresco) + 1 g Yeast Extract Bacteriological (Amresco) + 2 g NaCl (Lach-Ner) + 3 g Agar Bacteriological (Amresco) + destilovaná voda do 200 ml
- 2) sterilizace autoklávováním, zchlazení na cca 60 °C, přidání ampicilinu (Roth) do koncentrace 100 µg/ml a nalit do bakteriologických misek.

M9 médium:

- 1) 12,8 g Na_2HPO_4 + 3,9 g KH_2PO_4 + 0,5 g NaCl + 1,0 g NH_4Cl + destilovaná voda do 950 ml, pH 7,4
- 2) sterilizace autoklávováním, zchlazení na cca. 60 °C
- 3) 2,0 g glukózy + 0,494 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,0152 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,01 g Thiaminu + 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + destilovaná voda do 50 ml
- 4) 50 ml roztoku z kroku 3 se převede injekční stříkačkou s filtrem do 950 ml roztoku z kroku 1

SOC médium:

10g Trypton Casein Peptone + 2,5 g Yeast Extract Bacteriological + 0,25 g NaCl + 5 ml 250 mM KCl + 20 mM glukóza (Lach-Ner) + destilovaná voda do 500 ml

3.4 ROZTOKY A PUFRY

Akrylamidový gel nativní (20% zásobní roztok):

20 % akrylamid AA:bisAA v poměru 19:1 v TBE pufru

Akrylamidový gel denaturační (20% zásobní roztok):

20 % akrylamid AA:bisAA v poměru 19:1 v TBE pufru + 8M urea

Formamidový nanášecí pufr:

25 mg bromphenol blue + 25 mg Xylene Cyanol + 3,3 ml 150 mM Tris-base pH 7,6 + 6,6 ml 50% glycerolu + destilovaná voda do 10 ml

Freeze-Squze pufr:

3 M acetát sodný + 150 mM Tris-base

TAE pufr 50x:

242 g Tris-base + 57,1 g ledové kyseliny octové + 100 ml 0,5 M EDTA + destilovaná voda do 1 l

TBE pufr 20x:

0,9 M Tris-base + 0,9 M H_3BO_3 + 10 mM EDTA, pH 8,3 + destilovaná voda do 1 l

TEG:

25 mM Tris-HCl + 10 mM EDTA + 50 mM glukóza

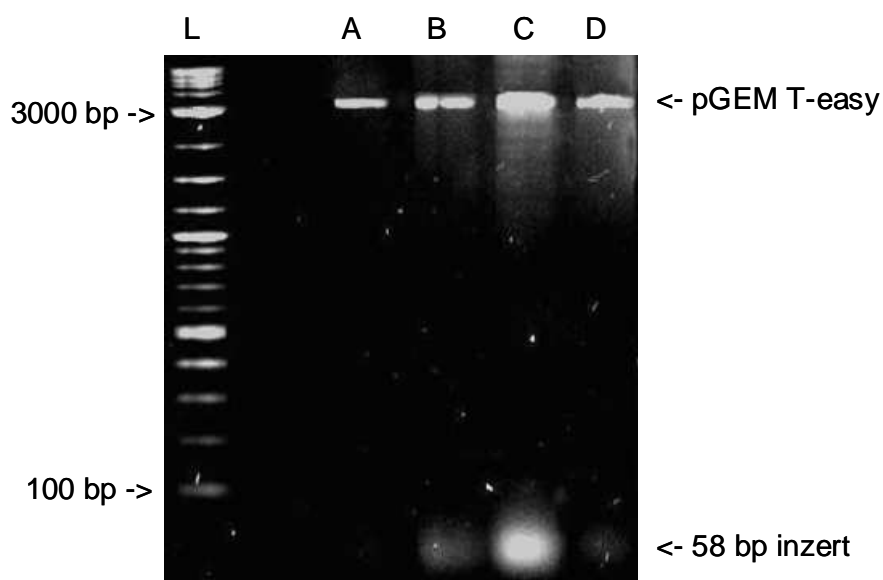
3.5 OSTATNÍ CHEMIKÁLIE

2-log DNA Ladder (New England Biolabs), acetát sodný (LachNer), agaróza (Serva), APS (peroxysíran amonný; Lach-Ner), BSA (New England Biolabs, Takkara), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner), DNA nanášecí pufr (Takkara), dNTPs (Takkara), ethanol (Lach-Ner), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner), glycerol (Lach-Ner), HCl (Lach-Ner), Chloramphenicol (Roth), IPTG (Roth), KH_2PO_4 (Lach-Ner), LiCl (Lach-Ner), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner), Na_2HPO_4 (Lach-Ner), NaOH (Lach-Ner), NH_4Cl (Lach-Ner), restriční enzymy + pufr (AclI, AlwI, CviKI-1, DraI, EcoR1, SetI; New England Biolabs, SibEnzyme), RNáza A (Quiagen), T4 DNA ligáza + pufr (New England Biolabs), SYBR green (Invitrogen), Taq DNA polymeráza + pufr (Takkara), Fussion-flash Taq DNA polymeráza (Finnzymes), TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin; Sigma-Aldrich), Thiamin (Sigma-Aldrich), X-gal (Duchefa Biochemie)

4. VÝSLEDKY

4.1. PŘÍPRAVA IZOTOPICKY ZNAČENÉHO DNA OLIGONUKLEOTIDU

Během anealingu byly dvě synteticky připravené vzájemně komplementární 34 bp dlouhé sekvence spojeny do dvouřetězcových DNA oligonukleotidů s jednobazovými A převisy. Tyto oligonukleotidy byly ligovány do plasmidu pGEM T-easy. Získanými plasmidy byly transformovány kompetentní buňky BL21. Pozitivní bakteriální kolonie obsahující inzert s vloženou DNA byly vybrány na základě tzv. „blue-white“ selekce, podle své bílé barvy vypovídající o přerušení LacZ genu. Plasmidová DNA byla izolována ze 100 ml M9 média. Poté byla stanovena koncentrace získané plasmidové DNA s výsledkem 967 $\mu\text{g/ml}$, což odpovídá $9,67 \cdot 10^{-2}$ g plasmidové DNA / 100 ml M9 média. Přítomnost inzertu byla dále ověřena kontrolní restrikcí vyizolovaných plasmidů enzymem EcoRI, jehož restrikční místa jsou v těsné blízkosti klonovacího místa plasmidu pGEM T-easy. Poté byla provedena elektroforéza v 1% agarózovém gelu, z něhož byl výsledek restrikce vyhodnocen. Z gelu vyplývá, že vybrané bakteriální kolonie produkovali rekombinantní plasmid s inzertem, o velikosti přibližně odpovídající 41 bp dlouhému inzertu + 17 bp z plasmidové DNA (viz obr. 4.1).

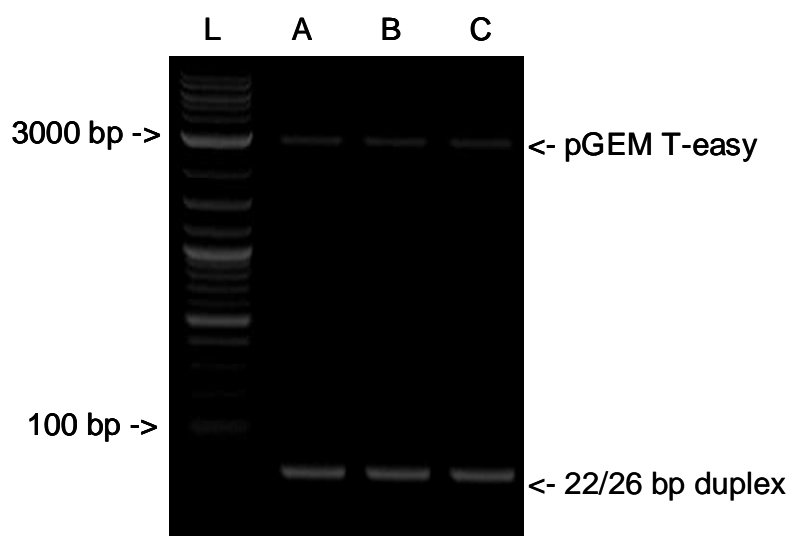


Obr. 4.1 kontrola přítomnosti inzertu v plasmidu; L: 2-log DNA ladder, A: plasmid bez restrikce, B-D: restrikce plasmidové DNA ze tří vybraných enzymem EcoRI.

Plasmidová DNA ze 3 vybraných kolonií byla poté osekvenována. K vyhodnocení sekvenační reakce byl použit program Sequence scanner. Ze

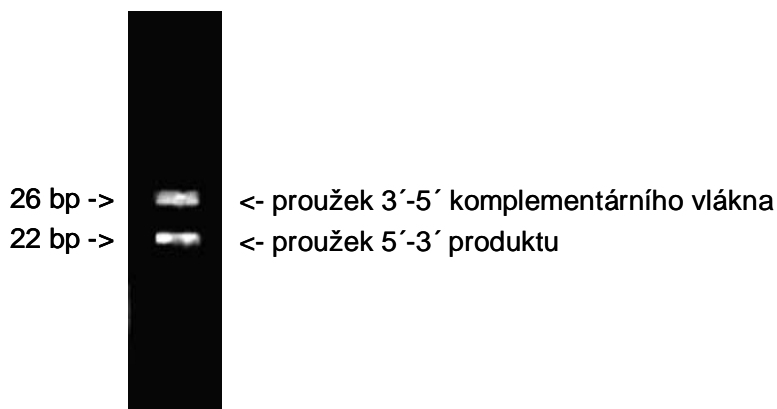
srovnání zjištěné sekvence inzertu se sekvencí komerčně připraveného oligonukleotidu bylo zjištěno, že během přípravy vektoru nedošlo v inzertové sekvenci ani v jejím bezprostředním okolí k mutaci, která by mohla poškodit vnesená restrikční místa i cílovou sekvenci samotnou.

Cílová sekvence byla z plasmidu izolována restrikcí enzymy SetI a CviKI-1, jejichž restrikční místa byla součástí objednávaných sekvencí. Poté byla provedena elektroforéza v 1% agarózovém gelu, z něhož byl výsledek restrikce vyhodnocen. Z gelu vyplývá, že použité restrikční enzymy jsou schopné vyštěpit vložený fragment DNA z plasmidu pGEM T-easy (viz obr. 4.2).



Obr. 4.2 výsledek restrikční reakce enzymy SetI a CviKI-1; L: 2-log DNA ladder, A-C: restrikce plasmidové DNA ze tří vybraných kolonií.

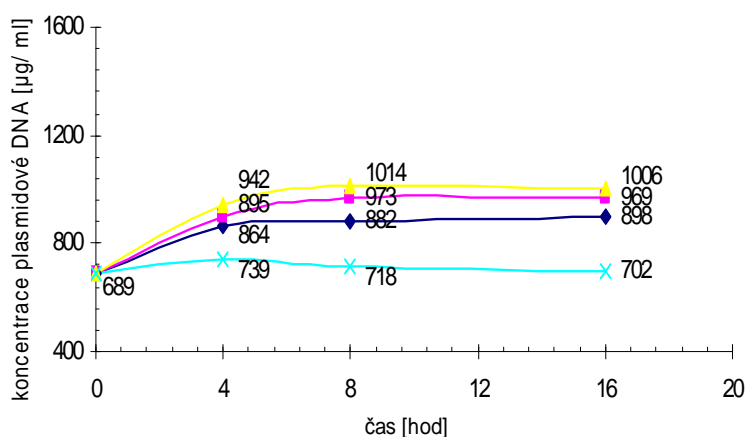
Finální ssDNA oligonukleotid byl získán oddělením dvou nestejně dlouhých vláken duplexu s čtyřbazovým převisem na 3'->5' vlákně pomocí elektroforézy v denaturančním 18% polyakrylamidovém gelu (viz obr. 4.3). Proužek gelu odpovídající cílové sekvenci byl vyříznut. Poté byla stanovena koncentrace z gelu vyizolované DNA. Zjištěná koncentrace se rovnala 2,26 $\mu\text{g/ml}$, což odpovídá 65 % teoreticky možného výtěžku ssDNA oligonukleotidu.



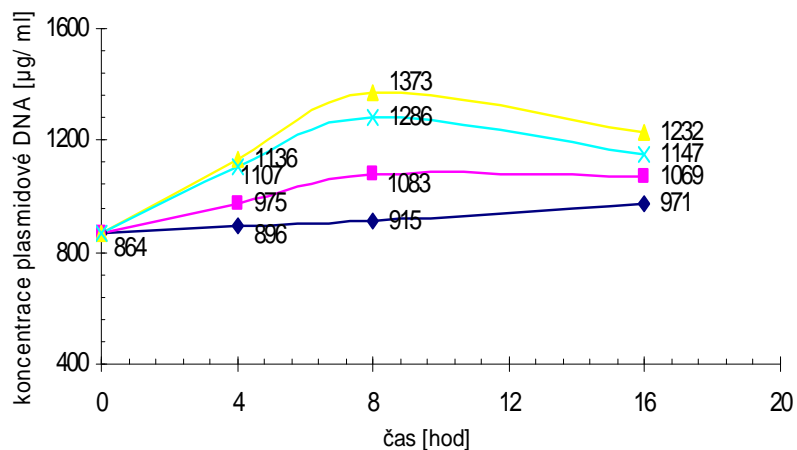
Obr. 4.3 výsledek elektroforézy v denurančním polyakrylamidovém gelu.

4.2 OPTIMALIZACE VÝTĚŽKU PLASM. DNA INDUKCÍ CHLORAMPHENICOLEM

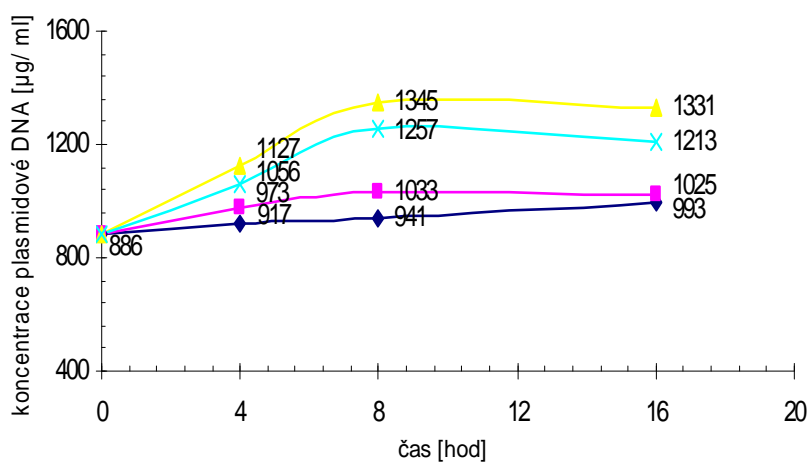
Optimalizace výtěžku plasmidové DNA byla provedena srovnáním množství plasmidové DNA získané ze vzorků bakterií pěstovaných v minimálním médiu bez indukce a ze vzorků bakterií indukovaných chloramphenicolem. Indukce byla prováděna chloramphenicolem o koncentracích 0, 100, 170 a 220 $\mu\text{g/ml}$, při $\text{OD}_{600} = 0,6; 0,9; 1,1$. Vzorky byly odebrány v intervalech po 4, 8 a 16 hodinách po indukci (viz. obr. 4.4, 4.5, 4.6). Nejvyšší koncentrace plasmidové DNA (1373 $\mu\text{g/ml}$), bylo dosaženo po osmi hodinové indukci chloramphenicolem o koncentraci 170 $\mu\text{g/ml}$, při $\text{OD}_{600} = 0.9$. Tato koncentrace odpovídá 1,42 násobku koncentrace plasmidové DNA získané při předešlé izolaci (viz 4.1).



Obr. 4.4 graf závislosti koncentrace plasmidové DNA na indukci bakteriální kultury chloramphenicolem; indukce při $\text{OD}_{600} = 0,6$; koncentrace chloramphenicolu [$\mu\text{g/ml}$]: kosočtverec = 0, čtverec = 100, trojúhelník = 170, křížek = 220. Z grafu vyplývá až 1,37 násobný nárůst koncentrace plasmidové DNA izolované z indukovaných bakterií oproti nejvyšší dosažené koncentraci plasmidové DNA z neindukovaných bakterií.



Obr. 4.5 graf závislosti koncentrace plasmidové DNA na indukci bakteriální kultury chloramphenicolem; indukce při $OD_{600} = 0,9$; koncentrace chloramphenicolu [$\mu\text{g/ml}$]: kosočtverec = 0, čtverec = 100, trojúhelník = 170, křížek = 220. Z grafu vyplývá až 1,41 násobný nárůst koncentrace plasmidové DNA vyizolované z indukovaných bakterií oproti nejvyšší dosažené koncentraci plasmidové DNA z neindukovaných bakterií.

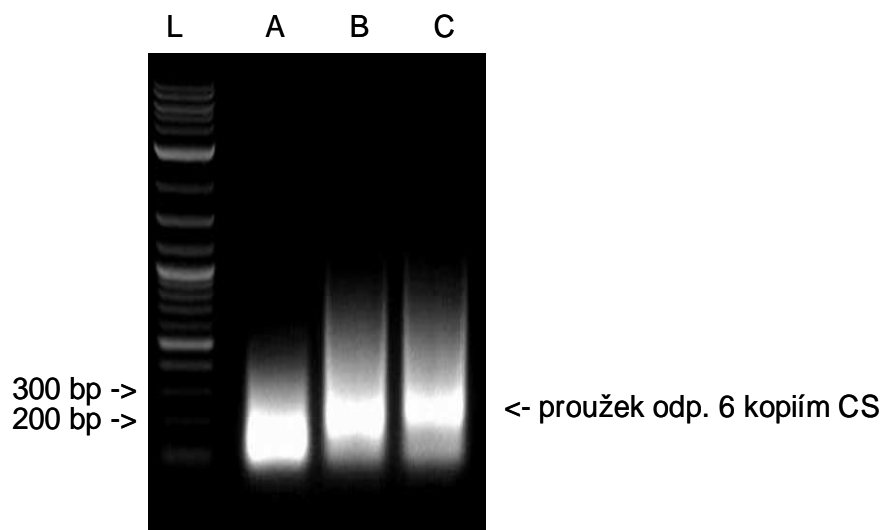


Obr. 4.6 graf závislosti koncentrace plasmidové DNA na indukci bakteriální kultury chloramphenicolem; indukce při $OD_{600} = 1,1$; koncentrace chloramphenicolu [$\mu\text{g/ml}$]: kosočtverec = 0, čtverec = 100, trojúhelník = 170, křížek = 220. Z grafu vyplývá až 1,35 násobný nárůst koncentrace plasmidové DNA vyizolované z indukovaných bakterií oproti nejvyšší dosažené koncentraci plasmidové DNA z neindukovaných bakterií.

4.3 MULTIPLIKACE CÍLOVÉ SEKVENCE

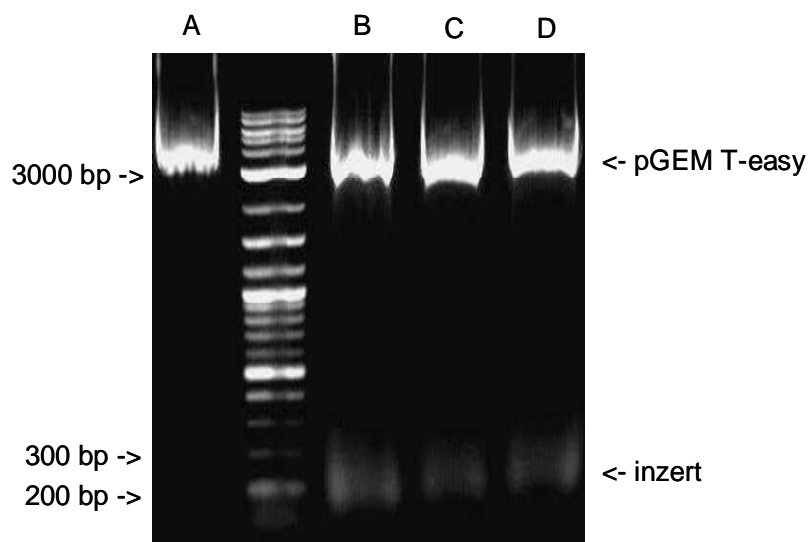
4.3.1 PŘÍPRAVA INZERTU LIGAČNÍ METODOU

Během anealingu byly 41 bp dlouhé sekvence HTSins1.1f a HTSins1.1r spojeny do dvouřetězcových DNA oligonukleotidů se čtyřbazovými AATT převisy. Těmito převisy se během ligační reakce vzájemně spojovaly. Produkty ligační reakce byly dále ampifikovány pomocí PCR. 20 bp dlouhé primery byly navrženy podle sekvencí HTSins1.1f a HTSins1. Poté byla provedena elektroforéza v 1% agarózovém gelu, z něhož byl výsledek ligační reakce, amplifikované pomocí PCR, vyhodnocen. Z gelu vyplývá, že ligační metodou jsme připravili produkty odpovídající až šesti kopiím cílové skvence (viz obr. 4.7).



Obr. 4.7 Výsledek multiplikace cílové sekvence ligační metodou; L: 2-log DNA ladder, A-C: DNA ze tří ligačních reakcí. (CS = cílová sekvence)

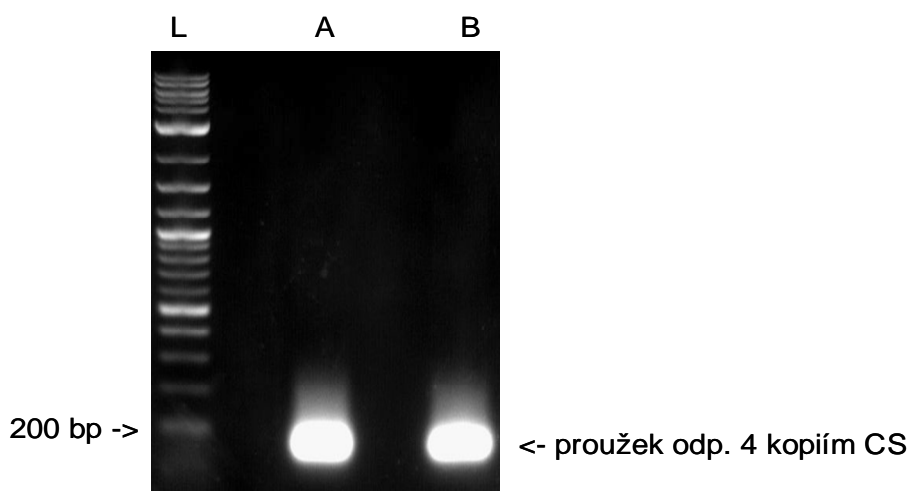
DNA, izolovaná z předešlého gelu, byla ligována do plasmidů pGEM T-easy, jimiž byly transformovány kompetentní buňky BL21. Poté byly vybrány pozitivní kolonie (viz 4.1) a přítomnost inzertu byla ověřena kontrolní restrikcí enzymem EcoRI. Poté byla provedena elektroforéza v 1% agarózovém gelu, z něhož byl výsledek restrikce vyhodnocen. Z gelu vyplývá, že bakterie jedné ze tří vybraných kolonií produkovali rekombinantní plasmid s inzertem, o velikosti přibližně odpovídající šesti kopiím cílové sekvence (viz obr. 4.8).



Obr. 4.8 kontrola přítomnosti inzertu v plasmidu; A: plasmid bez restrikce, L: 2-log DNA ladder, B-D: restrikce plasmidové DNA ze tří vybraných kolonií enzymem EcoRI.

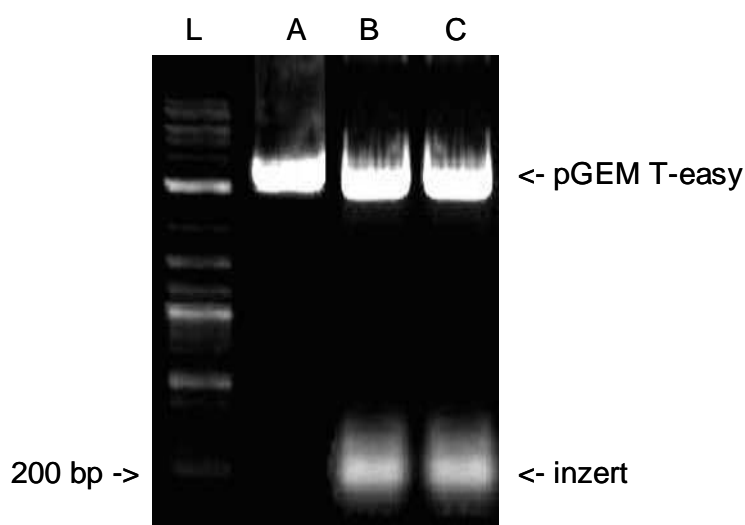
4.3.2 MULTIPLIKACE CÍLOVÉ SEKVENCE METODOU ESRA

Cílová sekvence byla multiplikována pomocí PCR reakce, od standardní reakce odlišné nepřítomností templátové DNA, ze sekvencí HTSins1.2f a HTSins1.2r. Pro amplifikaci řetězců, obsahujících více kopií cílové sekvence, byla provedena další PCR reakce s primery odvozenými od sekvencí HTSins1.2f a HTSins1.2r. Poté byla provedena elektroforéza v 1% agarózovém gelu, z něhož byl výsledek obou následných reakcí vyhodnocen. Z gelu vyplývá, že metodou ESRA jsme připravili produkty odpovídající čtyřem kopiím cílové sekvence (viz obr. 4.9).



Obr. 4.9 Výsledek multiplikace cílové sekvence metodou ESRA; L: 2-log DNA ladder, A a B: produkty amplifikace.

Amplifikovaná DNA byla ligována do plasmidů pGEM T-easy, jimiž byly transformovány kompetentní buňky BL21. Přítomnost inzertu v plasmidech, izolovaných z pozitivních kolonií, byla ověřena kontrolní restrikcí enzymem EcoR1. Poté byla provedena elektroforéza v 1% agarózovém gelu, z něhož byl výsledek restrikce vyhodnocen. Z gelu vyplývá, že obě vybrané bakteriální kolonie produkovaly rekombinantní plasmid s inzertem, o velikosti přibližně odpovídající čtyřem kopiím cílové sekvence (viz obr. 4.10).



Obr. 4.10 kontrola přítomnosti inzertu v plasmidu; L: 2-log DNA ladder, A: plasmid bez restrikce, B a C: restrikce plasmidové DNA ze dvou vybraných kolonií enzymem EcoRI.

5. DISKUZE

Cílem této bakalářské práce byla příprava ^{13}C , ^{15}N izotopicky značeného ssDNA oligonukleotidu pro potřeby NMR spektroskopie. Optimalizace metod přípravy izotopicky značených DNA oligonukleotidů tak, aby byl dosažen akceptovatelný poměr mezi technologickou proveditelností a ekonomickou únosností takové metody, je základním předpokladem pro rozvoj studií DNA pomocí NMR spektroskopie.

Srovnáním dostupných metod přípravy izotopicky uniformě značených DNA oligonukleotidů byla vybrána metoda přípravy v bakteriích pěstovaných na M9 (minimálním) médiu obsahujícím izotopicky značený zdroj uhlíku a dusíku (Louis et al., 1997; Ramanathan et al., 2001; René et al. 2006). Tato metoda velmi konkuruje způsobům přípravy izotopicky uniformě značených DNA oligonukleotidů enzymatickou syntézou (Zimmer & Crothers, 1995; Smith et al., 1997; Masse et al., 1998; Mer & Chazin, 1998) a PCR technikami (Chen et al., 1998; Louis et al., 1998), neboť umožňuje i poměrně levnou a nenáročnou přípravu delších oligonukleotidů. Svoji velkou flexibilitou v izotopickém značení, vyplývající z použitých zdrojů izotopů, se rovná přípravě izotopicky uniformě značených DNA oligonukleotidů chemickou syntézou (Ono et al., 1995; Fernandez et al., 1998; Tjandra et al., 2000; Kojima et al., 2001). V porovnání s ní je však výrazně levnější a méně komplikovaná. Stávající protokoly určené pro *in vivo* přípravu izotopicky značených dsDNA oligonukleotidů byly upraveny tak, aby je bylo možné použít pro přípravu ssDNA oligonukleotidů.

Dále byl touto metodou vyroben vzorek izotopicky značeného ssDNA oligonukleotidu. Z analýzy jeho koncentrace ovšem vyplynulo, že k výrobě množství vzorku nutného pro spektrální analýzu pomocí NMR by bylo nutné izolovat DNA ze 40 litrů izotopicky značeného minimálního média. Výroba takového množství média, při dnešních cenách 3200 Kč za 1 g ^{13}C izotopicky značené glukózy a 800 Kč za 1 g ^{15}N izotopicky značeného NH_4Cl + přibližně 8000 Kč za materiál a restriční enzymy, by stála 296.000 Kč. Proto byly provedeny experimenty s cílem zvýšit výtěžek DNA, potažmo výtěžek konečného produktu syntézy. Pro tento účel byly prověřeny dva postupy s odlišným přístupem k problému.

Nejprve byly provedeny experimenty s cílem zvýšit výtěžek plasmidové DNA, z níž se izoluje cílová sekvence. Experimenty spočívaly v porovnání výtěžků plasmidové DNA z bakterií indukovaných chloramfenikolem (Sambrook et al., 1982; Ramanathan et al. 2002) s výtěžkem plasmidové DNA z neindukovaných bakterií.

Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že tímto způsobem lze výtěžek plasmidové DNA zvýšit až 1,42x, konkrétně indukcí bakterií chloramphenicolem o koncentraci 170 µg/ml při $OD_{600} = 0,9$. Po takovéto optimalizaci by cena vzorku klesla o 28,7 % na 211.000 Kč.

V další fázi jsme se pokoušeli zvýšit počet studovaných oligonukleotidů v plasmidové DNA. Toho bylo dosaženo multiplikací cílové sekvence. Multiplikací cílové sekvence ligační metodou (Louis et al., 1998) bylo dosaženo šesti kopií cílové sekvence na inzert, multiplikací metodou ESRA (Louis et al., 1998; Ramanathan et al., 2001; René et al., 2006) kopií čtyř.

Ze zjištěných skutečností vyplývá, že kombinací zvýšení výtěžku plasmidové DNA a multiplikace cílové sekvence lze dosáhnout až 7,42 násobek koncentrace cílového produktu. To znamená, že množství minimálního média, nutného pro výrobu 1 mM NMR vzorku, při zachování stejného výtěžku cílového produktu, by mělo klesnout na 5,4 litrů -> cena uniformě ^{13}C , ^{15}N značeného 1mM NMR vzorku by celkově klesla na 47.000 Kč (cena takového vzorku, komerčně syntetizovaného u firmy Silantes se pohybuje mezi 100-110 tisíci Kč). Cena ^{13}C izotopicky značeného vzorku by odpovídala 43.000 Kč. Při uvažovaném studiu proton-N korelací, by absence ^{13}C izotopického značení cenu vzorku snížila až na 14.000 Kč.

6. ZÁVĚR

- bylo provedeno srovnání dostupných metod přípravy izotopicky uniformě značených ss a dsDNA oligonukleotidů pro NMR spektroskopii
- optimalizovanou metodou syntézy v bakteriích pěstovaných na izotopicky značeném minimálním M9 médiu byl vyroben vzorek ssDNA oligonukleotidu, jehož výtěžek nesplňoval požadavek na finanční dostupnost
- proto byla optimalizována výtěžnost plasmidové DNA, která by měla zvýšit výtěžek ssDNA oligonukleotidu 1,42 x
- dále byl připraven rekombinantní plasmid obsahující šest kopií ssDNA oligonukleotidu
- nadále se pracuje na přípravě izotopicky značeného vzorku ssDNA oligonukleotidu z plasmidu obsahujícího šest kopií ssDNA oligonukleotidu

7. LITERATURA

- **Ambruz A**, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones RA, Yang D (2006). Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed paralel/antiparalel strand in potassium solution. *Nucleic Acids Res.*, 34, 2723-2735.
- **Beabealashvilly RS**, Ivanov VL, Minchenkova LE, Savotchkina LP (1971). RNA polymerase1-DNA kompleks: study of the comformation of nucleic acids of the groving point of a RNA in a RNA polymerase-DNA system. *Biochem. Bophys. Acta*, 259, 35-40.
- **Becker M, Wang Z** (1989). B-A transitions within 5S ribosomal RNA gene are highly sequence-specific. *J. Biol. Chem.* 264, 4163-4167.
- **Brown BA**, Lowenhaupt K, Wilbert CM, Hanlon EB, Rich A (2001). The Z alpha domain of the editing enzyme dsRNA adenosine deaminase binds left-handed Z-RNA as well as Z-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 13532-13536
- **Brügner A**. X-LOR Version 3.1. Systems for X-RAY crystallography and NMR. Yale University Press.
- **Burge S**, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK (2006). Survey and sumary quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.*, 34, 5402-5415.
- **Chen X**, Mariappan S, Kelley JJ, Bushweller JH, Bradbury EM, Gupta G (1998). A PCR-based metod for uniform ¹³C/¹⁵N labeling of long DNA oligomers. *FEBS Lett.*, 436, 372-376.
- **Chou SH**, Chin KH, Wang AHJ (2003). Survey and sumary: Unusual DNA duplex and hairpin motifs. *Nucleic Acids Res.*, 31, 2461-2474
- **Dedmon MM**, Patel CN, Young GB, Pielak GJ (2002). FlgM gains structure in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 12681-12684.
- **Dickerson RE**, Drew HR, Conner BN, Wing RM, Fratini AV, Kopka ML (1982). The anatomy of A-, B- and Z-DNA. *Science*, 216, 475-485.
- **Eom SH**, Wang J, Steitz TA (1996). Structure of Taq DNA polymerase with DNA at the aktive site. *Nature*, 382, 278-281.

- **Flope N, Mackerell AD** (1999). Intrinsic conformational properties of deoxyribonucleosides: implicated role for cytosine in the equilibrium among the A, B and Z forms of DNA. *Biophys. J.*, 76, 3206-3218.
- **Florentiev VL, Ivanov VL** (1970). RNA polymerase: two-step mechanism with overlapping steps. *Nature*, 228, 519-525.
- **Henderson E, Harin CC, Walk SK, Finovo IJ, Blackburn EH** (1987). Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell*, 51, 899-908.
- **Hubbard JA, MacLachlan LK, King GW, Jones JJ, Fosbery AP** (2003). Nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals the functional state of the signaling protein Che Y in vivo in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 49, 1191-1200.
- **Ivanov VL, Minchenkova LE, Chernov BK, McPhie P, Ryu S, Garges S, Barber AM, Zhurkin VB, Adhya S** (1995). CRP-DNA complex: inducing the A-like form in the binding sites with an extended central spacer. *J. Mol. Biol.*, 245, 228-240.
- **Lin Y, Shih JW, Hsu CL, Lin JJ** (2001). Binding and partial denaturing of G-quartets DNA by Cdc13p of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 276, 47671-47674.
- **Jones S, Heyningen P, Berman HM, Thornton JM** (1999). Protein-DNA interactions: a structural analysis. *J. Mol. Biol.*, 287, 877-896
- **Louis JM, Martin RG, Clore GM, Cronenberg AM** (1998) Preparation of uniformly isotope-labeled DNA oligonucleotides for NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 273, 2374-2378.
- **Masse JE, Bortmann P, Dieckmann T, Feigon J** (1998). Simple efficient protocol for enzymatic synthesis of uniformly ¹³C, ¹⁵N-labeled DNA for heteronuclear NMR studies. *Nucleic Acid Res.*, 26, 2618-2624.
- **Mazur J, Sarai A, Jernigan RL** (1989). Sequence dependence of the B-A conformational transition of DNA. *Biopolymers*, 28, 1223-1233.
- **Mer G, Chazin WJ** (1998). Enzymatic synthesis of region-specific isotopically-labeled DNA oligomers for NMR analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 607-608.
- **Patel DJ, Bouzisz S, Kettani A, Wang Y** (1999). Structure of guanine-rich and cytosine-rich quadruplex formed in vitro by telomeric, centromeric and triplet repeat disease DNA sequences. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, 390-453.

- **Pilet J**, Blicharski J, Brahms J (1975). Conformations and structural transitions in polydeoxynucleotides. *Biochemistry*, 14, 1869-1876.
- **Ramanathan S**, Basuthkar JR, Chary KVR (2002). A novel approach for uniform ^{13}C and ^{15}N labeling of DNA for NMR studies. *Biochem. Biophys Res. Comm.*, 290, 928-932.
- **Reckel S**, Löhr F, Dötsch W (2005). In-cell NMR spectroscopy. *Chembiochem*, 6, 1601-1606.
- **René B**, Zargarian, L, Mauffret O, Femandian S (2006). General method of preparation of uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled DNA fragments for NMR analysis of DNA structure. *J. of Biomol. NMR*, 36, 137-146.
- **Sakai T**, Tochio H, Tenno T, Ito T, Kokubo H, Hiroaki M, Shirakawa M (2006). In-cell NMR spectroscopy of proteins inside *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. NMR spectroscopy*, 36, 179-188.
- **Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- **Serber Z**, Dötsch W (2001). In-cell NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 40, 14318-14323.
- **Shindo H**, Matsumoto N, Shimizu M (1997). Dynamics in the isomerization of intramolecular DNA triplex in supercoiled plasmids. *Nucleic Acid Res.*, 25, 4786-4791.
- **Sinden RR** (1994). *DNA structure and function*. Academic press, Sun Diego.
- **Spiridonova VA**, Kopylov AM (2002). DNA aptamers as radically new recognition elements for biosensors. *Biochemistry*, 67, 706-709.
- **Sun H**, Karow JK, Hickson JD, Maizels N (1998). The bloom's syndrome helicase unwind G4 DNA. *J. Mol. Chem.*, 273, 27587-27592.
- **Sun H**, Yabuki A, Maizels N (2001). Human nuclease specific for G4 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 12444-12449.
- **Vodrážka Z**, Krechl J (1991). *Bioorganická chemie*. Nakladatelství technické literatury, Praha.
- **Wagner G**, Hybers SG, Havel TF (1992). NMR structure determination in solution: A critique and comparison with X-Ray crystallography. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21, 167-198.

- **Zimmer DP**, Crothers DM (1995). NMR of enzymatically synthesized uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled DNA oligonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3091-3095.

Internetové zdroje:

- <http://www.pdb.org/>