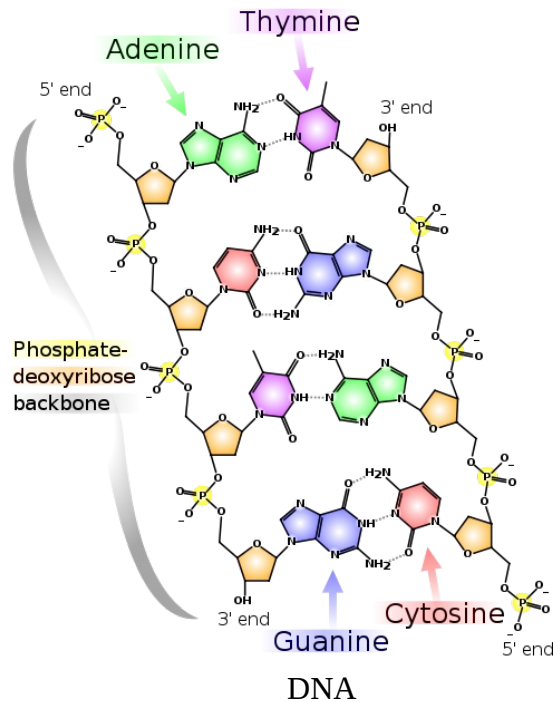


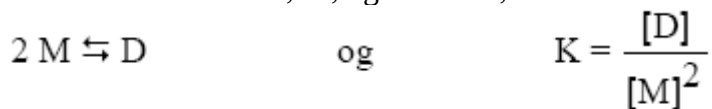
DNA-smeltetemperaturbestemmelse

Introduktion

Oligonucleotider er ofte benyttet til at holde nanopartikler sammen med hinanden. Den ene enkeltstreng er kovalent bundet til den ene partikel, og den anden er kovalent bundet til den anden, og når de to enkeltstrengene er komplementære, vil de to nanopartikler kunne bindes til hinanden ved duplexdannelse. Styrken af bindingen mellem de to nanopartikler afhænger af bindingsstyrken/stabiliteten af den duplex, der dannes, når hybridiseringen sker. Når man skal sammenligne stabiliteten af forskellige hybridiserede oligonucleotider (= to komplementære, enkeltstrengede oligonucleotider, der har dannet en duplex) bestemmer man den såkaldte smeltetemperatur, T_m . Imodsætning til en "rigtig" DNA-duplex,



der under biologiske forhold ikke splitter totalt men kun i bidder (under replikation og transskription), så kan den proces der sker, når man opvarmer en oligonucleotid duplex, betragtes som en "all-or-none" proces, dvs. enten er alle baser bundet til hinanden, eller også er duplexen fuldstændig adskilt. Det betyder, at den termodynamiske beskrivelse af processen bliver meget simplere, da processen kan betragtes som en simpel ligevægt mellem to monomerer, M , og en dimer, D :



Spm. 1.: Hvis den totale koncentration af monomer betegnes med CT hvad er så sammenhængen mellem CT , $[D]$ og $[M]$?

I denne øvelse benyttes oligonucleotidet 5'-GTGGCCAC-3'.

Spm. 2: Hvad er det specielle ved dette oligonucleotid?

Smeltetemperaturen, T_m , defineres som den temperatur, hvor præcis halvdelen af monomererne findes på monomerform og den anden halvdel på duplexform, som illustreret i figuren på næste side.

Spm. 3: Udtryk ligevægtskonstanten ved T_m (K_{T_m}) vha. C_T , når der er tale om et oligonucleotid, som det der er anvendt i denne øvelse.

Spm. 4: Udled udtrykket $\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^\circ} \ln C_T + \frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ}$ udfra $\left(\frac{\delta \ln K}{\delta T}\right)_P = \frac{\Delta H}{RT^2}$,
 $\Delta C_p = 0$

Denne øvelse har til formål at bestemme de termodynamiske parametre for smelteprocessen af oligonucleotidet 5'-GTGGCCAC og dens komplementære streng. Da selve målingen af T_m for en enkelt koncentration af en duplex tager næsten 4 timer, kan I ikke nå at bestemme T_m for mere end en enkelt koncentration, men på hjemmesiden findes en excel-fil med data for 5 koncentrationer, som andre har målt.

Bestemmelsen af T_m er baseret på måling af UV-absorptionen ved $\lambda = 260$ nm som funktion af temperaturen.

Spm. 5: Hvilke dele af nucleotiderne absorberer ved $\lambda = 260$ nm?

Metoden er baseret på, at absorptionskoefficienterne, ϵ_{260} , afhænger af, om oligonucleotiderne indgår i en duplex, eller i en monomer.

Der er to måder at bestemme T_m på ud fra de eksperimentelle data: enten som illustreret i figuren, ved at finde de to (lineære) basisligninger og korrigere de eksperimentelle med' (260) dem, eller ved at finde maximum for den 1. afledede af den eksperimentelle Abs vs. T kurve ved brug af GrafIt 3.0

En anden måde at analysere kurvernes maximum er at bruge funktionen SLOPE i Excel (I den danske udgave hedder funktionen: STIGNING men er beskrevet i HJÆLP under HÆLDNING).

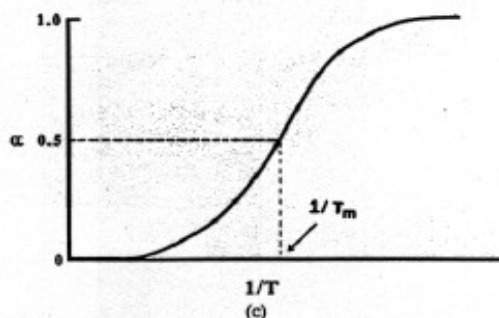
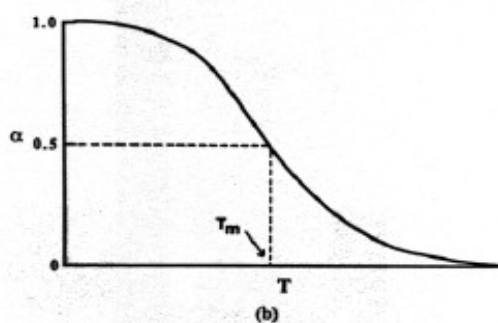
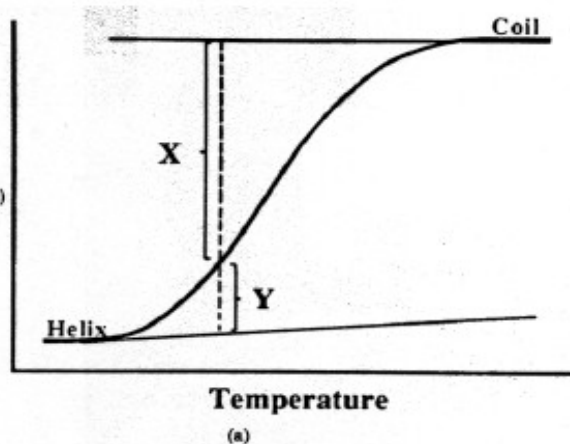


Fig. 1. (a) A typical absorbance vs temperature melting curve. X corresponds to the distance between an upper baseline and the curve, while Y represents the distance between the lower baseline and the curve. (b) A plot of α vs T , where α equals the fraction of single strands in the duplex state. This curve is derived from (a) as described in the text. (c) A plot of α vs $1/T$ where α equals the fraction of single strands in the duplex state.

Praktiske anvisninger

De to opløsninger – bufferopløsningen (ultrarent vand, 1,00 M NaCl, 0,1 mM Na₂EDTA, 10mM fosfatbuffer pH 7) og stamopløsningen indeholdende oligonucleotidet i førnævnte bufferopløsning. Stamopløsningens koncentration er 58,8 μ M -GTGGCCAC-monomer. I spektrofotometeret anvendes der kuvetter med en lysvej på 5 mm og et volumen på 1 ml.

Spm. 6: Opskriv Lambert-Beers lov. Hvad kan være den molekylære forklaring til, at værdien af ϵ_{260} afhænger af om de er i duplex- eller monomerform?

Spm. 7: Beregn hvor stor en mængde oligonucleotidstamopløsning og hvor stor en mængde bufferopløsning I skal anvende for at få den anviste CT-værdi.

1) Åbn softwaren: AvaSpec6.2.

2) Indstil den rigtige integrationstid ved at åbne shutteren på lampen, være i *Scope-mode* (S) i programmet og indstil tiden så detektoren ikke overmættes (14000 counts).

3) For ikke at få alt for meget støj kan antallet gennemsnit (*average*) med fordel øges, fx til 100.

4) Optag et referencespektrum mod luft (uden kuvette) ved at være i *scope-mode* (S), sørg for at der kommer lys igennem til detektoren og tryk på ikonet til venstre med den lysende pære.

5) Luk shutteren igen. Optag et mørkespektrum ved nu at trykke på ikonet med den slukkede pære.

6) I kan nu skifte til *Absorbance-mode* (A) og så er I klar til optage spektrene.

Kuvetten vi anvender er af kvarts og har en teflonprop. Berør aldrig de blanke sider (det er dem, lyset skal passere) med fingrene. Pas også godt på at I ikke ridser kuvettens sider med termometret.

Når kuvetten sættes i kuvetteholderen er det vigtigt at kobberskiven og kuvetten holdes parallelle og sættes i holderen samtidigt – kobberskiven længst ind mod midten. Optag først et spektrum af kuvetten uden noget i og se efter om den giver et rent spektrum, dvs. at der ikke er nogle mærkelige buler og toppe i spektret. Optag derefter et af kuvetten med bufferopløsning. Dette spektrum anvendes senere som reference, dvs. at I i databehandlingen subtraherer bufferspektret fra alle jeres målte spektre. Når I gemmer spektrene vælges formatet *Processed Spectra* (diskette-ikonet).

Kuvetten rengøres med deioniseret vand, skylles med ethanol og tørres grundigt med luft. Derefter fylder I den med buffer og DNA-opløsning til den ønskede koncentration. Vælg den rigtige størrelse pipette til at afmåle den beregnede mængde oligonucleotidopløsning. Fyld den afmålte mængde oligonucleotidopløsning i kuvetten. Afmål på samme måde den beregnede mængde bufferopløsning (HUSK at skifte pipettespids!) og anbring det i kuvetten (hvor det samlede volumen nu er 1,0 ml). Sæt prop på og vend forsigtigt kuvetten nogle gange for at få en homogen blanding. Tør ydersiden af kuvetten af med et linsepapir og kontroller, at der ikke er luftbobler i kuvetten. Anbring kuvetten og kobberskiven i spektrofotometeret. Smeltekurven optages ved at måle et spektrum af DNA-opløsningen ved bestemte temperaturer. I starter ved 25 °C og fortsætter i spring af ca 5 °C indtil I er 10 °C fra det forventede smeltepunkt (se spm. 9). Springene skal i dette område være på 1-2 °C. Det er ikke vigtigt at springene er eksakt 5 °C, men det er vigtigt at de ikke er for store, og at I ved hvert målepunkt bestemmer den nøjagtige temperatur af prøven lige inden I optager spektret. Pas på at der ikke kommer for meget af opløsningen med op hver gang i tager termometret op – alternativt kan man få termometeret til at stå så det ikke generer strålegangen. Når I har nået 70 °C køles opløsningen ned igen til 20 °C, evt. i spring af ca. 10 °C hvis meget af øvelsetiden allerede er gået. Temperaturen i vandbadet ændres ved at indstille termostaten. Når termostaten er tæt ved den satte temperatur ventes i passende lang tid (4-5 min) så hele systemet opnår en ny konstant

temperatur. Ved de højeste temperaturer er der 3-4 °C forskel mellem det I måler i kuvetten og det I har indstillet termostaten til.

Spm. 8: Hvorfor er det observerede smeltepunkt under opvarmning ikke nødvendigvis det samme som vil kunne opnås under nedkøling?

Når I har fået målepunkter og gemt alle spektra er der mulighed for at få hjælp til databehandling i Grafit 3.0.

Kuvetten rengøres grundigt med vand og skylles efter med ethanol.

Sammenligning med andre værdier

Da DNA og oligonucleotider har været et centralt emne i forskningen i over 50 år (dobbelthelixstrukturen blev publiceret i 1953), er der arbejdet meget på at kunne beregne T_m samt ΔH° og ΔS° ud fra en kendt sekvens. Det viser sig, at de nærmeste naboer i π -stacken har stor betydning.

Nedenstående tabel giver anvisning på, hvordan ΔH° og ΔS° (og dermed T_m) kan beregnes for duplexdannelse for givne oligonucleotider og deres komplementære.

Table 1: Nearest-Neighbor Thermodynamic Parameters for Watson-Crick Base Pair Formation in 1 M NaCl^a

propagation sequence	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (eu)	ΔG°_{37} (kcal/mol)
AA/TT = TT/AA	-7.9 ± 0.2	-22.2 ± 0.8	-1.00 ± 0.01
AT/TA	-7.2 ± 0.7	-20.4 ± 2.4	-0.88 ± 0.04
TA/AT	-7.2 ± 0.9	-21.3 ± 2.4	-0.58 ± 0.06
CA/GT = TG/AC	-8.5 ± 0.6	-22.7 ± 2.0	-1.45 ± 0.06
GT/CA = AC/TG	-8.4 ± 0.5	-22.4 ± 2.0	-1.44 ± 0.04
CT/GA = AG/TC	-7.8 ± 0.6	-21.0 ± 2.0	-1.28 ± 0.03
GA/CT = TC/AG	-8.2 ± 0.6	-22.2 ± 1.7	-1.30 ± 0.03
CG/GC	-10.6 ± 0.6	-27.2 ± 2.6	-2.17 ± 0.05
GC/CG	-9.8 ± 0.4	-24.4 ± 2.0	-2.24 ± 0.03
GG/CC	-8.0 ± 0.9	-19.9 ± 1.8	-1.84 ± 0.04
Init. w. term. C-G ^b	0.1 ± 1.1	-2.8 ± 0.2	0.98 ± 0.05
Init. w. term. A-T ^b	2.3 ± 1.3	4.1 ± 0.2	1.03 ± 0.05
Symmetry corr.	0	-1.4	0.4

Data og tekst taget fra:

H.T. Allawi, J. SantaLucia, "Thermodynamics and NMR of Internal G-T Mismatches in DNA", *Biochemistry*, 36 (1997) 10583

Se også side 172-175 i lærebogen (FK)

^a Errors are resembling standard deviations (see text). ^b See text for how to apply the initiation parameters

Two parameters are introduced: "initiation with terminal G-C" and "initiation with terminal A-T" (Table 1). A duplex with two terminal G-C pairs would use total initiation = 2 × (initiation with terminal G-C). A duplex with one terminal G-C and one terminal A-T would use total initiation = (initiation with terminal G-C) + (initiation with terminal A-T). A duplex with two terminal A-T pairs would use total initiation = 2 × (initiation with terminal A-T).

Exempel: 5'-GGAATT-3'
3'-CCTTAA-5'

$$\begin{aligned} \Delta H^\circ &= \Sigma \Delta H^\circ(\text{naboer}) + \Delta H^\circ(\text{init}) = \Delta H^\circ(\text{GG/CC}) + \Delta H^\circ(\text{GA/CT}) + \\ &\Delta H^\circ(\text{AA/TT}) + \Delta H^\circ(\text{AT/TA}) + \Delta H^\circ(\text{TT/AA}) + \Delta H^\circ(\text{C-G-init}) + \Delta H^\circ(\text{A-T-init}) \\ &= -8.0 + (-8.2) + (-7.9) + (-7.2) + (-7.9) + 0.1 + 2.3 = -36.8 \text{ kcal/mol} \end{aligned}$$

Spm. 9: Hvad er værdierne af ΔH° og ΔS° for den i øvelsen anvendte sekvens, når man benytter dataene i ovenstående tabel? Brug disse værdier til at beregne den teoretiske T_m værdi.

Usikkerheden beregnes ved: $\text{usikkerhed} = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$

Databehandling

Foruden jeres egne data skal I også benytte de data der findes på hjemmesiden. Aflæs T_m for de 5 DNA smeltepunktskurver, ved forskellige koncentrationer (DNA figure), der ligger på kursushjemmesiden. Bestem T_m for jeres forsøg enten i Grafit 3.0, excel eller et lignende program. Hvis I bruger excel kan I bruge det tips der står på side 2.

Bruger i Grafit 3.0, der er tilrådighed i lab, skal i indtaste temperatur og absorbans i hver sin kolonne. Kolonner renames i data-rename. Den 1-afledede findes ved at bruge manipulate-derivative, for abs vs. T_m . Lav til sidst plot af abs vs. T_m , 1-afledede vs. Temp og $1/T_m$ vs $\ln(Ct)$ under new- x/y graph

Spm. 10: Bestem T_m , ΔH° og ΔS° for jeres datasæt. Sammenlign disse værdier med de teoretiske værdier fundet i spm 9.

Der findes på internettet adskillige hjemmesider, hvor både T_m , ΔH° og ΔS° kan beregnes for givne sekvenser under standardbetingelser.

Spm. 11: Hvad er fx forudsigelserne for T_m og ΔH° og ΔS° for den i øvelsen anvendte oligonucleotid på hjemmesiderne, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>? Og hvad er grundlaget for deres estimater?

Spm. 12: Hvordan forholder disse værdier sig til dem, I har bestemt eksperimentelt og i spm. 9?