

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Pavla Ottová

Mikrokalorimetrické stanovení změn energie při tvorbě duplexu DNA

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Studijní program: Fyzika, Obecná fyzika

2007

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli při realizaci mé bakalářské práce, především Prof. RNDr. Josefu Štěpánkovi, CSc. za všestrannou pomoc a ochotu při vedení mé práce.

Dále bych chtěla velice poděkovat RNDr. Vladimíru Kopeckému, Ph.D. za zaškolení v práci s mikrokalorimetrem a za podnětné rady v souvislosti s tímto přístrojem.

Velmi bych chtěla poděkovat i Doc. RNDr. Jiřímu Bokovi, CSc. za naprogramování softwaru na zpracování dat naměřených pomocí mikrokalorimetru.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne 28. 5. 2007

Pavla Ottová

Obsah

Úvod	5
ZÁKLADY DSC ROZPADU DUPLEXŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN	6
1 Nukleové kyseliny	6
1.1 Primární struktura nukleových kyselin	6
1.2 Sekundární struktura nukleových kyselin	8
1.3 Duplex DNA	8
1.4 Síly stabilizující duplex	9
1.5 Denaturace a renaturace duplexu	9
1.6 Termodynamické parametry spojené s tvorbou komplexu	10
2 Mikrokolorimetrie	12
2.1 Historie diferenční skenovací kalorimetrie	12
2.2 Dnešní diferenční skenovací kalorimetry	13
2.3 Princip měření	14
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
3 Mikrokolorimetr	15
4 Použité vzorky	18
4.1 Vzorky nukleových kyselin	18
4.2 Použité pufry	18
4.3 Příprava vzorků	18
VÝSLEDKY MĚŘENÍ A JEJICH VYHODNOCENÍ	20
5 Měření na mikrokolorimetru	20
5.1 Odvzdušňování roztoků před vložením do kalorimetru	20
5.2 Plnění kyvet roztokem	20
5.3 Než začne měření vzorku	21
5.4 Měření vzorku	21
5.5 Plnění kyvet vzorkem „on the fly“	22
5.6 Vymývání kyvet	22
6 Zpracování výsledků měření a jejich diskuse	23
6.1 Příprava dat na zpracování	23
6.2 Možné přístupy k analýze dat	25
6.3 Výsledky zpracování dat	31
6.4 Jeden vzorek v různých koncentracích	31
6.5 Dva vzorky o stejné koncentraci	36
6.6 Vzorek poly(A)+poly(U)	37
Závěr	39
Literatura	40

Název práce: Mikrokalořimetrické stanovení změn energie při vzniku duplexu DNA
Autor: Pavla Ottová
Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK
Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.
e-mail vedoucího: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt: Tato práce se zabývá charakterizací termodynamických vlastností vybraných duplexů nukleových kyselin. Měření rozpadu a tvorby duplexů bylo provedeno na diferenčním skenovacím mikrokalořimetru. Experimentální data byla úspěšně analyzována pomocí dvoustavového modelu. Byly určeny termodynamické parametry přechodu (změna entalpie ΔH a entropie ΔS) a teploty tání pro DNA nonamery za různých koncentrací a pro duplexy RNA homopolymerů. Práce rovněž ukázala na možnosti a meze použití přístroje pro studia nukleových kyselin.

Klíčová slova: duplex DNA, mikrokalořimetrie, DSC, entalpie, entropie, teplota tání.

Title: Microkalořimetric determination of energy changes at DNA duplex formation
Author: Pavla Ottová
Department: Institute of Physics of Charles University
Supervisor: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.
Supervisor's e-mail address: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: This work deals with characterization of thermodynamic properties of nucleic acids duplexes. The measurements of the duplex disintegration and formation were performed by using a differential scanning microcalorimeter. Experimental data were analyzed successfully by means of a two-state model. The thermodynamic parameters of the transition (enthalpy and entropy changes ΔH and ΔS) and the melting temperature were determined for DNA nonamers at various concentrations and for RNA homopolymers. The work has also pointed out the possibilities and limitations of the device in application to nucleic acid research.

Keywords: DNA duplex, microcalorimetry, DSC, enthalpy, entropy, melting temperature.

Úvod

Snažíme se rozluštit tajemství nukleových kyselin, protože to jsou nejdůležitější molekuly pro zachování života ve všech známých buněčných organismech. S nukleovými kyselinami se setkáváme i u virů, které sice za živé organismy nepovažujeme, ale které na nich parazitují. V deoxyribonukleové kyselině (DNA) je uložena genetická informace u všech živých organismů. Ta se při dělení buněk replikuje. Naproti tomu má ribonukleová kyselina (RNA) v buňkách několik odlišných funkcí. Messenger RNA (mRNA) řídí ribosomální syntézu polypeptidů, strukturní a funkční úlohu má ribosomální RNA (rRNA), transferová RNA (tRNA) přináší aminokyseliny na ribosom při syntéze proteinů, dále se RNA v buňkách nachází ve formě ribonukleoproteinů, které zajišťují některé posttranskripční úpravy RNA. U některých virů nese RNA genetickou informaci.

Nukleové kyseliny mohou vytvářet různé lokální struktury spojené se specifickou biologickou funkcí. Základní strukturní motivy nukleových kyselin jsou již dobře známy, je však třeba poznávat geometrické, energetické i kinetické vlastnosti konkrétních sekvenčních motivů nukleových kyselin a případně i jejich chemicky modifikovaných analogů.

Bakalářská práce byla motivována pořízením nového mikrokalorimetru na Fyzikální ústav Univerzity Karlovy. Tento přístroj umožňuje sledovat a kvantitativně popisovat termodynamické chování biomolekul za poměrně nízkých koncentrací a v nevelkém objemu. Náplní práce bylo provedení a vyhodnocení několika experimentů s rozpadem a tvorbou duplexů nukleových kyselin s cílem prověření nového přístroje, charakterizace jeho přesnosti a odhadu koncentračních limitů.

Předložená práce je rozdělena do tří hlavních částí. První část je teoretická a je věnována nukleovým kyselinám a mikrokalorimetrii. Ve druhé části je popsán měřicí přístroj a použité vzorky. Ve třetí části je nejprve na základě získaných zkušeností popsán způsob měření kalorimetrem. V dalších úsecích této části je proveden rozbor různých variant přístupů ke zpracování dat a jsou prezentovány a diskutovány výsledky jednotlivých měření.

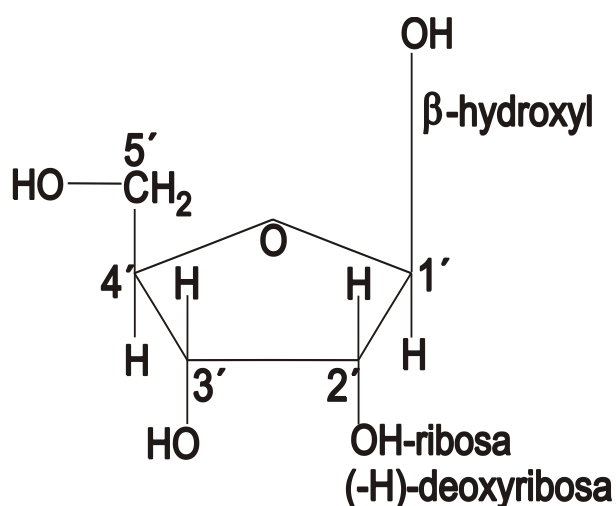
ZÁKLADY DSC ROZPADU DUPLEXŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN

1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou biologicky velmi významné makromolekuly, proto je důležité znát jejich strukturu a vlastnosti. Struktura dvoušroubovice nukleových kyselin byla rozluštěna na počátku 50. let minulého století. Mezi nukleové kyseliny patří deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA). Popis struktury nukleových kyselin rozlišujeme na několika úrovních. Primární struktura je dána posloupností nukleotidů a sekundární struktura prostorovým uspořádáním celé molekuly, případně i společným uspořádáním více molekul, jak tomu může být u šroubovicovitých struktur. V následujících podkapitolách zmíníme základní rysy struktury nukleových kyselin, podrobnější informace lze nalézt např. v [Saenger, 1984; Voet a Voetová, 1995].

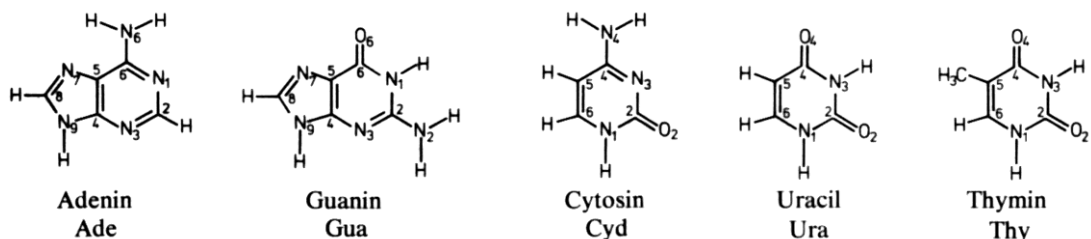
1.1 Primární struktura nukleových kyselin

Stavebními jednotkami nukleových kyselin jsou nukleotidy. Každý nukleotid se skládá z nukleosidu a fosfátu. Fosfát je zbytek kyseliny fosforečné. Jako nukleosid označujeme dusíkatou bázi a sacharidovou jednotku. Dusíkatá báze je na sacharid připojena přes uhlík 1' N-glykosidickou vazbou. Torzní úhel χ kolem N-glykosidické vazby popisuje orientaci dusíkaté báze vůči sacharidovému cyklu. Existují dvě základní konformace, *syn* (poloha báze směrem k sacharidu) a *anti* (od sacharidu). Zbytek kyseliny fosforečné je připojen esterovou vazbou na hydroxyl na uhlíku 5'.



Obrázek 1.1: Sacharidová jednotka [Palacký, 2005].

Sacharidovou jednotkou je pětičlenný furanosový cyklus, viz. obr. 1.1. V případě DNA je to β -D-2'-deoxyribofuranosa a v případě RNA β -D-ribofuranosa. Cukerné pentózové cykly tvoří planární strukturu, protože tato konformace je pro ně energeticky nevýhodná. Preferované konformace (neboli puckering) sacharidového kruhu jsou *C2'-endo* a *C3'-endo*. Konformace *endo* znamená, že atomy $C2'$ a $C3'$ vybočují do stejného poloprostoru jako atom $C5'$ vzhledem k rovině jader $C1'-O-C4'$. Pro samostatné nukleosidy je v případě konformace sacharidu *C2'-endo* častější orientace dusíkaté báze *syn*, v případě *C3'-endo* zase *anti*.

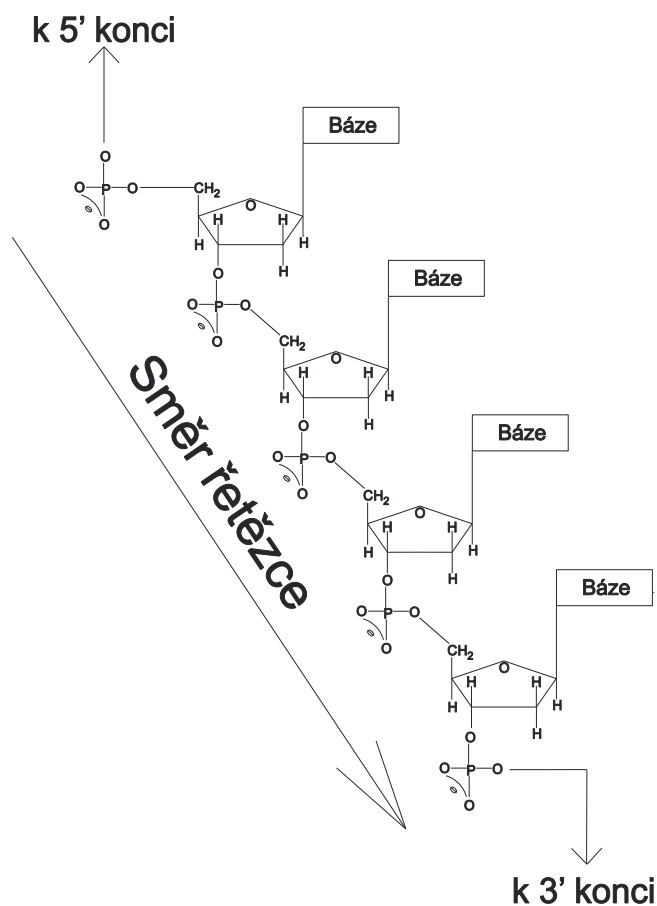


Obrázek 1.2: Přehled dusíkatých bází vyskytujících se v nukleových kyselinách [Saenger, 1984].

Dusíkaté báze jsou heterocyklické sloučeniny odvozené od pyrimidinu a purinu. Samostatné purinové nukleosidy zaujímají obě konformace (*syn* i *anti*) vůči sacharidu a u samostatných pyrimidinových nukleosidů převažuje konformace *anti*. V nukleových kyselinách se převážně vyskytuje následujících pět bází, viz. obr. 1.2, (3 pyrimidinové a 2 purinové), ale mohou se vyskytnout i jiné báze, které jsou však jen modifikací některé z obvyklých bází. Nejčastější pyrimidinové báze v nukleových kyselinách jsou cytosin (C), thymin (T) a uracil (U), přičemž cytosin se vyskytuje v DNA i RNA, zatímco thymin se vyskytuje pouze v molekule DNA a v molekule RNA je nahrazen uracilem. Thymin je methylovaná forma uracilu a obě molekuly jsou funkčně ekvivalentní. Purinové báze jsou adenin (A) a guanin (G). Adenin i guanin se vyskytují v DNA i v RNA. Všechny dusíkaté báze mají planární geometrii (samozřejmě kromě methylové skupiny thyminu). Planarita dusíkatých bází je velmi důležitá při stabilizaci sekundární struktury (tzv. stacking).

Nukleotidy se mohou spojovat fosfodiesterovou vazbou mezi hydroxyly na uhlíku 3' jednoho sacharidu a na uhlíku 5' následujícího sacharidu. Vzniká tedy polynukleotid, což je lineární polymerní řetězec nukleotidů vzájemně vázaných diesterovou vazbou. Vzniklý řetězec má jeden volný 5' konec a jeden volný 3' konec. Řetězce se mohou dále prodlužovat navázáním dalšího nukleotidu na 3' konec. Podle délky řetězce rozlišujeme mono-, oligo- a polynukleotidy.

Polymerní řetězce nukleotidů se tedy skládají z cukr-fosfátového skeletu, na který jsou připojeny různé dusíkaté báze, viz. obr. 1.3, proto primární strukturu nukleových kyselin popisujeme pořadím bází. Pořadí bází uvádíme od 5' konce k 3' konci.



Obrázek 1.3: Primární struktura vlákna nukleových kyselin (DNA) [Palacký, 2005].

1.2 Sekundární struktura nukleových kyselin

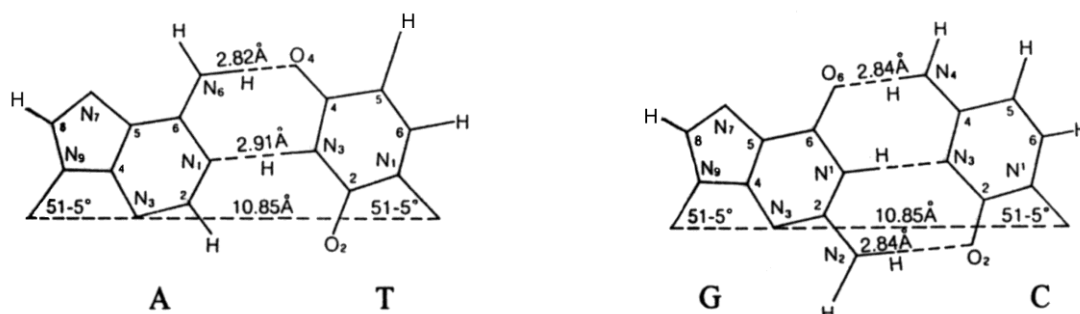
Sekundární strukturou rozumíme prostorové uspořádání molekuly. Řetězec zaujímá v prostoru jisté uspořádání, které je dané silami působícími mezi jednotlivými atomy a energetickou výhodností pro celou molekulu. V prostorovém uspořádání se molekula DNA liší od RNA. DNA většinou tvoří šroubovicovitou strukturu z jednoho nebo více vláken, ale může se vyskytovat i ve formě náhodného klubka. RNA zůstává v roztoku většinou jednovláknová a v prostoru zaujímá složitou strukturu. Na krátkých úsecích může RNA tvořit dvoušroubovicovitou strukturu spárovaných bází dvou částí jednoho vlákna; na konci takového useku je smyčka nespárovaných bází. V některých virech však může být i RNA dvouvláknová tvořená dvěma komplementárními vlákny molekul RNA. Nukleové kyseliny netvoří rigidní struktury, jejich konformace jsou proměnlivé a závisí na mnoha faktorech.

Práce je zaměřena na energetické změny při vzniku duplexu, proto se dále budeme věnovat pouze této sekundární struktuře.

Dvoušroubovicovitou sekundární strukturu DNA rozluštili v roce 1953 James Watson a Francis Crick na základě rentgenového difrakčního obrazce. Byl navržen model prostorového uspořádání, který odpovídal tehdejšímu experimentálnímu poznatku. Tento objev bývá označován jako zrod moderní molekulární biologie.

1.3 Duplex DNA

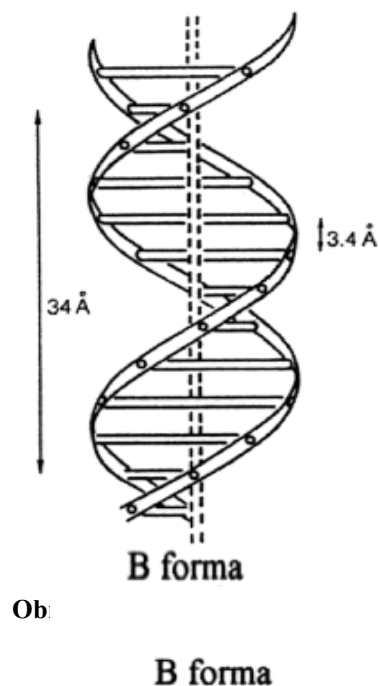
Tvorba duplexu je podmíněna specifickým párováním bází. Duplex je tvořen dvěma řetězci DNA, které mají vzájemně komplementární báze složení. Duplex se splétá ze dvou vzájemně antiparalelních řetězců, které se vinou jeden okolo druhého tak, že nemohou být rozděleny bez rozpletení šroubovice. Zastoupení jednotlivých bází v duplexu se řídí Chargaffovými pravidly. Podle těchto pravidel mají stejné zastoupení adeninové a thyminové (popř. uracilové) zbytky a stejný počet je i guaninových a cytosinových zbytků. Tato pravidla formuloval už ve 40. letech Erwin Chargaff.



Obrázek 1.4: Watson-Crickovo párování bází [Vaisocherová, 2002].

Komplementární páry jsou podle Watson-Crickova modelu adenin s thyminem (nebo uracilem v RNA) a guanin s cytosinem. Báze páry se vzájemně spojují vodíkovými můstky. Adenin s thyminem (nebo uracilem) vytvářejí dva vodíkové můstky, zatímco guanin s cytosinem vytváří tři vodíkové můstky, viz. obr. 1.4. Dusíkaté báze jsou planární a i vzniklý báze pár zůstává téměř planárním útvarem. Takto vytvořené komplementární báze páry vyplňují vnitřek dvoušroubovice a cukr-fosfátová páteř zůstává natočena ven, protože takto dochází k minimálnímu odpuzování mezi nabitými fosfátovými skupinami. Mezi fosfosacharidovými řetězci jsou dva žlábků, větší a menší žlábek.

Bylo zjištěno, že existuje několik forem duplexů, které se liší strukturálními parametry. Přehled strukturálních parametrů běžných konformací duplexu lze najít např. v [Saenger, 1984; Voet a Voetová, 1995]. Zde uvedeme pouze některé parametry nejběžnější (nativní) formy, kterou je tzv. B-forma, viz. obr. 1.5. Její struktura se pouze nepatrně liší od ideální Watson-Crickovy struktury. Jde o pravotočivou dvoušroubovici, na jednu otáčku vychází 10 bázových párů. Bázové páry jsou přibližně kolmé na osu dvoušroubovice a vzájemně jsou sousední páry natočeny o 36° . U této formy jsou oba žlábký hluboké, jeden je však široký a druhý úzký. Stoupání připadající na jeden bázový pár je 340 pm a tedy stoupání závitů šroubovice je 3,4 nm.



Ob.

1.4 Síly stabilizující duplex

Ve struktuře nukleových kyselin bylo pozorováno, že puriny a pyrimidiny vytvářejí z paralelních molekul stohy (stacks), tedy aromatické kruhy dusíkatých bází se k sobě natáčejí plochami a jejich π -elektrony spolu interagují. Jedná se o formu Van der Waalových interakcí. Stacking je závislý na vzájemné orientaci bází umístěných nad sebou, na jejich vzájemném překryvu a roste s délkou řetězce. Stacking je určitým způsobem specifický, protože do jisté míry závisí na sekvenci bází. Nejsilnější je pro purin-purin, potom je purin-pyrimidin a nejslabší je pro pyrimidin-pyrimidin. Stacking vytváří uvnitř dvoušroubovice hydrofobní prostředí. Stacking je entalpicky výhodný a entropicky nevýhodný proces.

Vodíkové můstky jsou velice důležité z hlediska specifického párování bází, avšak ke stabilitě dvoušroubovice přispívají vodíkové můstky jen velice málo. Při studiu stability duplexu je ovšem nutné počítat i nimi. Vazba vodíkovým můstkem je asi 20 – 30krát slabší než vazba kovalentní, je lokalizovaná a směřovaná. Ve vodném roztoku mohou báze tvořit vodíkové můstky i s molekulami vody, ale uvnitř duplexu je hydrofobní prostředí, proto jsou vodíkové můstky přednostně vytvářeny a stabilizovány mezi bázemi. Z toho plyne, že stacking podporuje párování bází vodíkovými můstky.

Stabilita duplexu je ovlivněna mnoha dalšími faktory, jako jsou teplota, tlak, délka duplexu, zastoupení bázových párů, ale také rozpouštědlo a koncentrace iontů v prostředí.

1.5 Denaturace a renaturace duplexu

Formální analogii mezi šroubovicovou a krystalovou strukturou můžeme spatřit ve fyzikálních vlastnostech: obě struktury se rozpadají při teplotě tání a obě vznikají a formují se až po vzniku jádra. U duplexu hraje roli jádra spojení tří bázových párů. Formace počátečních bázových párů je spojena s nepříznivým kladným příspěvkem k volné energii. Po vytvoření stohu tří následujících bázových párů se vytvoří jádro, které se stále může jednoduše rozdělit, ale připojování dalších bázových párů k jádru je už spojeno s příznivým záporným příspěvkem k volné energii. Další růst duplexu je již spontánní [Saenger, 1984].

Teplotu tání duplexu definujeme jako teplotu, při níž je právě polovina molekul ve formě komplexu a zbytek je uvolněn na jednotlivá vlákna. Teplota tání, značíme T_m (melting temperature), roste s délkou šroubovice, s koncentrací iontů v prostředí a se vzrůstajícím počtem G-C párů (důvodem je větší počet vodíkových můstků).

Denuraci nazýváme zhroucení dvoušroubovicové struktury vlivem zahřátí nad charakteristickou teplotu tání nebo zvýšením pH v roztoku se vzorkem duplexu DNA. Dojde k narušení nukleotidových párů, komplementární řetězce se rozpletou na dvě samostatná vlákna, která zaujmou v prostoru konformaci náhodného klubka (random coil), což je spojeno se změnou stackingu. Denaturace je doprovázena kvalitativními změnami fyzikálních vlastností vzorku DNA, například klesá viskozita roztoku. Denaturace je kooperativní proces, což znamená, že zhroucení šroubovicovité struktury v jedné části destabilizuje celý komplex.

Při rychlém ochlazení denaturované DNA pod teplotu tání T_m dojde pouze k částečnému spárování bází, komplementární řetězce nebudou mít dostatek času na to, aby se našly. Pokud však budeme vzorek ochlazovat pomalu, postupně dojde k plné renaturaci vzorku. Denaturace je tedy vratný proces, celý mechanismus připomíná rozepínání a zapínání zipu [Saenger, 1984].

Pro experimentální studium tohoto jevu je možné použít dva základní typy metod. Velmi časté jsou spektroskopické metody, jako jsou UV-absorpce, Ramanova spektroskopie nebo cirkulární dichroismus. Druhou metodou je mikrokolorimetrie. Ta poskytuje přesnější stanovení termodynamických parametrů než metody spektroskopické.

1.6 Termodynamické parametry spojené s tvorbou komplexu

Přechod $duplex \leftrightarrow volná\ vlákna$ pro dvoušroubovicovitou strukturu můžeme aproximovat dvoustavovým modelem. V tomto modelu uvažujeme, že vlákna DNA jsou buď úplně spojená v duplex, nebo úplně rozpojená na volná vlákna.

Vezmeme v úvahu rovnováhu danou vztahem (1.1) pro spojování ne-auto-komplementárních sekvencí a vytváření n -měrní struktury [Breslauer, 1995].



kde n je molekularita reakce, která odpovídá počtu vláken spojujících se v komplex (v případě duplexu je $n = 2$). Rovnovážnou asociační konstantu můžeme vyjádřit vztahem [Breslauer, 1995]:

$$K = \frac{[A_1 \dots A_n]}{[A_1] \dots [A_n]} = \frac{\alpha}{\left(\frac{C_T}{n}\right)^{n-1} (1-\alpha)^n}, \quad (1.2)$$

kde α , udávající poměrný počet vláken v komplexech, je parametr přechodu závislý na teplotě a C_T je celková koncentrace složek komplexů (vláken). Předpokládá se, že všechny složky komplexu mají stejnou koncentraci, tedy (C_T/n) .

Pokud definujeme rovnovážnou konstantu při teplotě tání, můžeme za α dosadit $1/2$. Potom rovnovážná konstanta při T_m je dána výrazem:

$$K_{T_m} = \frac{1}{\left(\frac{C_T}{2n}\right)^{n-1}}. \quad (1.3)$$

Van't Hoffova rovnice pro entalpii přechodu je:

$$\Delta H_{vH} = -RT^2 \left[\frac{d \ln K}{dT} \right]. \quad (1.4)$$

Vzorec pro vypočítání entalpie přechodu s obecnou molekuláritou lze odvodit ze vztahů uvedených výše a je dán rovnicí (1.5) [Breslauer, 1995]:

$$\Delta H_{vH} = (2 + 2n)RT_m^2 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T=T_m}. \quad (1.5)$$

Pro případ duplexu je molekulárita $n = 2$ a vztah (1.5) se redukuje na vztah:

$$\Delta H_{vH} = 6RT_m^2 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T=T_m}. \quad (1.6)$$

Pro změnu Gibbsovy energie platí vztah (indexem „⁰“ značíme rovnovážný stav, tedy jedná se o změny termodynamických potenciálů mezi komplexy a samostatnými složkami v rovnovážném stavu charakterizovaném teplotou T):

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0. \quad (1.7)$$

Změnu Gibbsova potenciálu však můžeme vyjádřit i pomocí rovnovážné konstanty následující rovnicí:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K. \quad (1.8)$$

Kombinací vztahů (1.3), (1.7) a (1.8) dostaneme lineární závislost převrácené hodnoty teploty tání na $\ln C_T$. Z tohoto vztahu lze určit termodynamické parametry spojené s tvorbou a rozpadem n složkového komplexu [Breslauer, 1995].

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1)R}{\Delta H^0} \ln C_T + \frac{[\Delta S^0 - (n-1)R \ln 2n]}{\Delta H^0}. \quad (1.9)$$

Dosazením do vztahu (1.9) $n = 2$ dostaneme vzorec pro bimolekulární komplex vznikající ze dvou řetězců, které nejsou auto-komplementární:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^0} \ln C_T + \frac{\Delta S^0 - R \ln 4}{\Delta H^0}. \quad (1.10)$$

2 Mikrokalorimetrie

Úkolem bakalářské práce bylo sledování energetických změn při vzniku duplexu DNA pomocí mikrokalorimetrických měření. Taková měření jsou možná díky velkému pokroku v oblasti mikrokalorimetrie. Tento technologický pokrok velmi zvýšil citlivost mikrokalorimetrů a umožnil měření množství tepla na úrovni několika mikrowattů. Mikrokalorimetrie je významná metoda pro zkoumání termodynamického chování biologicky významných molekul, jakými jsou právě nukleové kyseliny, v roztoku. Popisuje energetiku a kinetiku jejich reakcí a poskytuje informaci o stabilitě molekul. Do budoucna by mikrokalorimetrie na pracovišti měla poskytovat důležité informace pro vývoj nových efektivních farmak.

Vývojem a výrobou přístrojů pro mikrokalorimetrická měření se zabývají v současné době zejména dvě firmy, Calorimetric Sciences Corporation (CSC) a Microcal. Obě firmy nabízejí pro komerční využití dva typy přístrojů lišících se technologií měření. Jde o izotermální titrační kalorimetrii a o diferenční skenovací kalorimetrii. V rámci této práce se budeme věnovat pouze druhé z jmenovaných technologií.

K tomu, abychom byli schopni pochopit energetické vlastnosti makromolekul, je důležité znát závislost jejich tepelné kapacity na teplotě, případně entalpii (integrál tepelné kapacity podle teploty) jako funkci teploty. Entalpie, jakožto extenzivní veličina, a teplota, jakožto intenzivní veličina, jsou fundamentální konjugované veličiny, jejich funkční závislost postačí k získání celé termodynamické informace o makroskopickém stavu systému. Analýzou tepelné kapacity biomolekul získáme popis jejich nativního a tepelně denaturovaného stavu. Potíže s experimentálním určením těchto funkčních závislostí souvisí se stanovením tepelných kapacit ve značně zředěných roztocích, tedy za podmínek, kdy tepelná kapacita pozadí (rozpouštědla) je srovnatelná nebo dokonce převyšuje tepelnou kapacitu zkoumaných molekul. Takováto měření vyžadují velmi precizní přístroje, a proto byly vyvinuty speciální přístroje umožňující přesné měření tepelných kapacit biomolekul, to jest diferenční skenovací mikrokalorimetrie [Privalov, 1995].

2.1 Historie diferenční skenovací kalorimetrie

Vývoj dnešních diferenčních skenovacích kalorimetrů začíná v polovině 60. let 20. století, kdy byl vytvořen první kalorimetr. Tento přístroj měl na tehdejší dobu skvělou citlivost měření, která téměř o tři řády převýšila citlivosti v té době používaných přístrojů. Citlivost byla zvýšena kombinací několika metod: využitím diferenčních měření, kompenzací energie, postupným kontinuálním ohřevem a kompletní termální izolací kyvet kalorimetru. K odstranění teplotních gradientů uvnitř kyvet byla zapotřebí miniaturizace celé měřící jednotky a hlavně kyvet mikrokalorimetru. Po zmenšení objemu kyvet již nebylo nutné mechanické míchání kontinuálně ohřívané kapaliny.

V prvních kalorimetrech, které mohli zkoumat molekuly pouze ohřevem, byly vzorky ohřívány konstantním příkonem. V měřící jednotce byly umístěny dvě kyvety, které byly kompletně izolovány od okolí. Jako adiabatická izolace sloužilo vysoké vakuum a systém termálních stěn. Nevýhodou byla nereprodukovatelnost naměřených dat, což způsobovala nemožnost získání stejných experimentálních podmínek. Kyvety

se musely po každém měření vyjmout z adiabatického izolačního systému, vymýt, znovu naplnit a umístit zpět do adiabatického systému. První kalorimetry umožňovaly měření pouze ostrých teplotních efektů a neposkytovaly absolutní hodnoty parciální tepelné kapacity, tedy sloužily spíše ke kvalitativnímu pozorování, než ke kvantitativnímu měření.

Vzhledem k nevýhodám prvních kalorimetrů bylo navrženo zlepšení v podobě přesně daného objemu kyvet, což zaručovalo stejný objem i po znovunaplnění kyvet. Dalším pokrokem bylo, že kyvety již nebylo nutné vyndávat z adiabatického systému. Kyvety se plnily a vymývaly pomocí kapilárních trubiček. Tím se zajistily stejné experimentální podmínky. Nyní už byla data reprodukovatelná i po vymytí a opětovném naplnění kyvet vzorkem. První takový kalorimetr byl vyvinut na začátku 70. let ruskou Akademií věd.

Na konci 70. let byly vytvořeny kalorimetry, označované jako 3. generace skenujících mikrokolorimetrů, s platinovými kapilárními kyvetami. Kapilární kyvety ještě zmenšily možnost vzniku teplotního gradientu uvnitř kyvet a umožnily naplnění kyvet s omezením vzniku bublin, což bylo velice důležité, protože i mikroskopické bublinky mohou způsobit nezanedbatelné chyby v měření. Tlakování kyvet rozšířilo teplotní škálu nad 100 °C (bez přidaného tlaku by vodné roztoky při teplotách nad 100 °C vřely, což znemožňuje měření).

I 3. generace však měla určité nevýhody. Platinové kyvety způsobovaly u některých roztoků nereprodukovatelnost. Platina je známá jako silný katalyzátor a aktivní absorbátor hydrogenů. Nahrazení platiny zlatem se však setkalo s technologickým problémem (konstrukcí kyvet z kapilárních trubiček z čistého zlata). Konstantní ohřev rovněž nebyl vhodný, protože se vzrůstající teplotou kyvet rostla i jejich tepelná kapacita, což velice ovlivnilo měření. Dalším prvkem nepříznivě ovlivňujícím měření bylo použití organických materiálů (lepidlo a elektrická izolace). Tyto materiály byly použity i v předchozích modelech, ale jejich citlivost nebyla dostatečně vysoká na odhalení tohoto nedostatku.

Dnešní kalorimetry patří do tzv. 4. generace mikrokolorimetrů. Nevýhody 3. generace byly odstraněny a dokonce tyto kalorimetry dovolují skenovat ohřívání i chlazení vzorku se stejnou citlivostí, ačkoliv předchozí kalorimetry vůbec neumožňovaly měření při ochlazování. Další vývoj mikrokolorimetrů souvisí se zvyšováním citlivosti přístrojů [Privalov, 1995].

2.2 Dnešní diferenční skenovací kalorimetry

Dnešní kalorimetry umožňují měření jak při ohřívání, tak i při ochlazování kyvet se stejnou citlivostí. Termální plášť je ohříván a chlazen konstantní rychlostí. Teplotu kontroluje počítač. Počítač měří napětí na platinovém teploměru a porovnává ho s referenčním napětím, které nastavuje na hodnotu odpovídající požadované teplotě. Počítač se snaží minimalizovat rozdíl mezi tímto referenčním napětím a údajem teploměru. Počítač tedy přímo kontroluje teplotu termálního pláště, a proto jsou kyvety ohřívány a chlazeny konstantní rychlostí.

Kyvety jsou vyrobeny z 24karátového zlata. Kapilární trubičky (vstup a výstup z kyvet) sloužící k plnění a mytí kyvet jsou vyrobeny z platiny. Senzory a rezistory (vyrovnávací ohříváče) jsou umístěny na povrchu kyvet [Privalov, 1995].

Ve víčku chránícím platinové kapilární trubičky, kterými se kalorimetr plní, je umístěn tlakovací píst. Tímto pístem se dosáhne tlaku až 3 atm. Tlak je měřen počítačem. Tlak 3 atm je dostatečný k tomu, aby měření ve vodných roztocích bylo

možno ohřívat až do teploty 130 °C, aniž by docházelo k tvorbě plynových bublinek a varu.

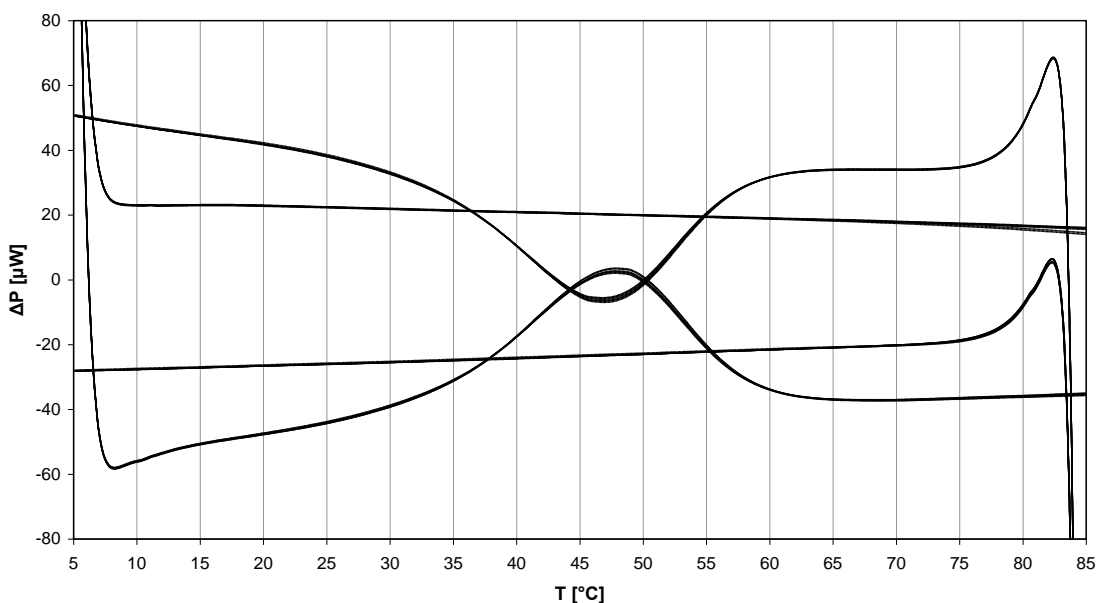
V ideálním případě by měly být referenční a vzorková kyveta naprosto shodné. Z technických důvodů však není možné vyrobit identické kyvety. Rozdíl mezi referenční a vzorkovou kyvetou způsobuje rozdíl naměřených dat mezi ohřevem a ochlazováním při naplnění obou kyvet stejnou látkou.

Počítač neustále řídí teplotu kyvet. Když neprobíhá experiment, tak udržuje teplotu na 25 °C, a proto je nutné nechávat počítač neustále zapnutý. Další důležitou věcí je, aby kyvety kalorimetru byly stále naplněny. V době kdy se na kalorimetru neměří stačí naplnit kyvety deionizovanou vodou [Privalov, 1995].

2.3 Princip měření

Diferenční skenovací kalorimetr je vhodný pro měření rozdílu v tepelných kapacitách dvou kapalin (rozpouštědla a roztoku). Abychom však mohli tento rozdíl naměřit, je nutné nejprve naplnit obě kyvety rozpouštědlem a změřit tzv. baselinu v celé teplotní škále, ve které chceme měřit vzorek. Toto měření slouží jako kalibrační. Je možné aproximovat ho polynomiální funkcí a při měření vzorku zobrazovat výsledek po jeho odečtení. Jinou možností je použít referenční křivku k určení korekce příkonu nutné k úplnému vykompenzování odchylky baseliny od nuly. Baselinu je v každém případě nutné před zpracováním dat odečíst od samotného měření vzorek-rozpouštědlo. Po naměření baseliny se naplní vzorková kyveta vzorkem. Počítač zaznamenává velikost vyrovnávacího příkonu v mikrowattech, který odpovídá rozdílu tepelných kapacit studovaného roztoku a rozpouštědla v celé teplotní škále (typický záznam z mikrokolorimetrického měření je na obr. 2.1) [Privalov, 1995].

Originální záznam z měření



Obrázek 2.1: Originální DSC záznam z měření vzorku duplexu DNA (9 bp, Match9 + Kompl9). Rychlost ohřívání i chlazení byla 1 K/min. Koncentrace duplexu v roztoku byla 0,57 mM; rozpouštědlo: 25 mM TRIS, 10% D₂O. Na obrázku jsou zachyceny jak průběhy baseliny (malé zakřivení uprostřed teplotního intervalu), tak měření se vzorkem.

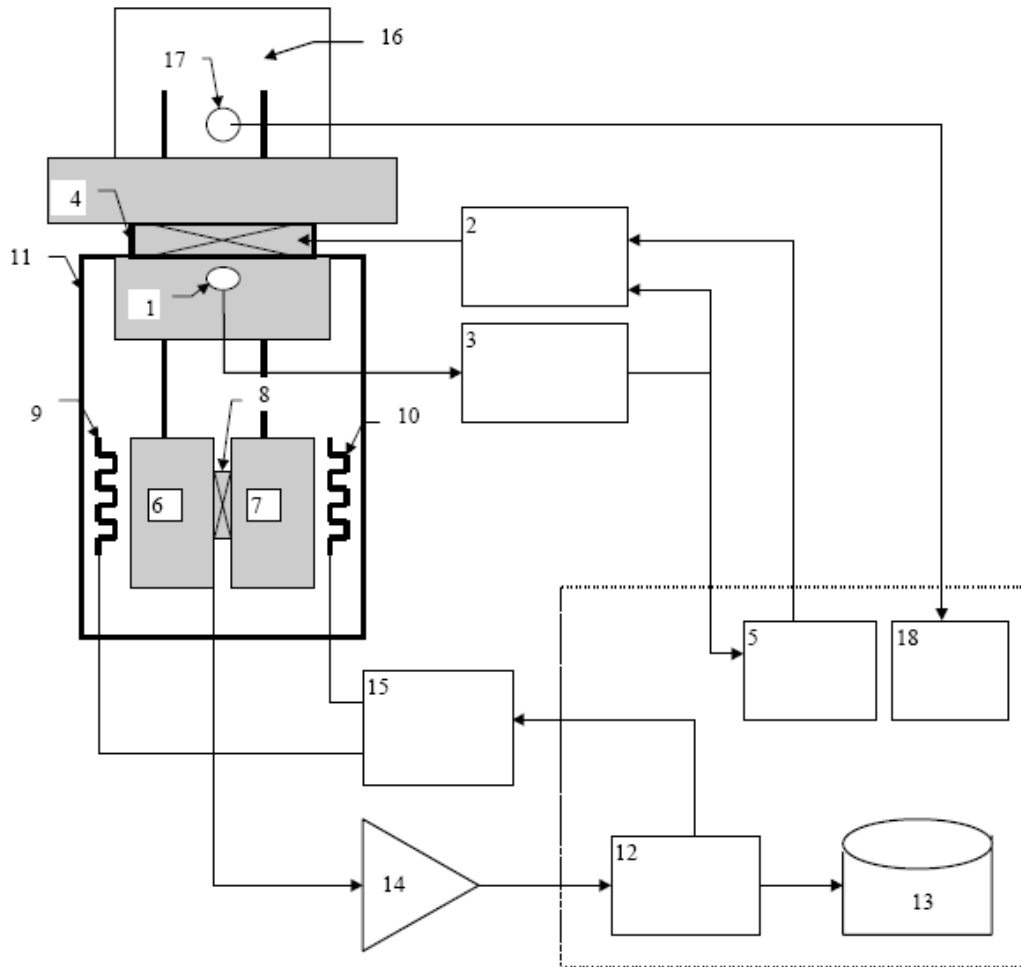
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3 Mikrok calorimetr

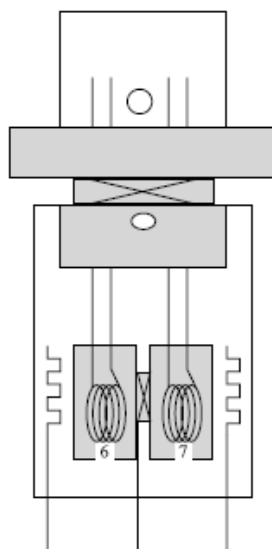
Na oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu UK byl zakoupen nový přístroj, který umožňuje mikrok calorimetrická měření. Jedná se o model 6100 Nano-DSC II, diferenční skenovací mikrok calorimetr. Přístroj je od firmy Calorimetric Sciences Corporation. Tento typ kalorimetru byl speciálně navržen pro měření tepelné kapacity biopolymerů. Technické parametry přístroje udávané výrobcem jsou uvedeny tabulce 3.1. Na obrázku 3.1a je schéma mikrok calorimetru a na 3.1b je detail měřící jednotky mikrok yvet. Na obrázku 3.2 je snímek měřící aparatury a detail prostoru přístupů kyvet a na obrázku 3.3 je odvodušňovací a promývovací zařízení.

Tabulka 3.1: Technické parametry přístroje CSC 6100 Nano-DCS II.

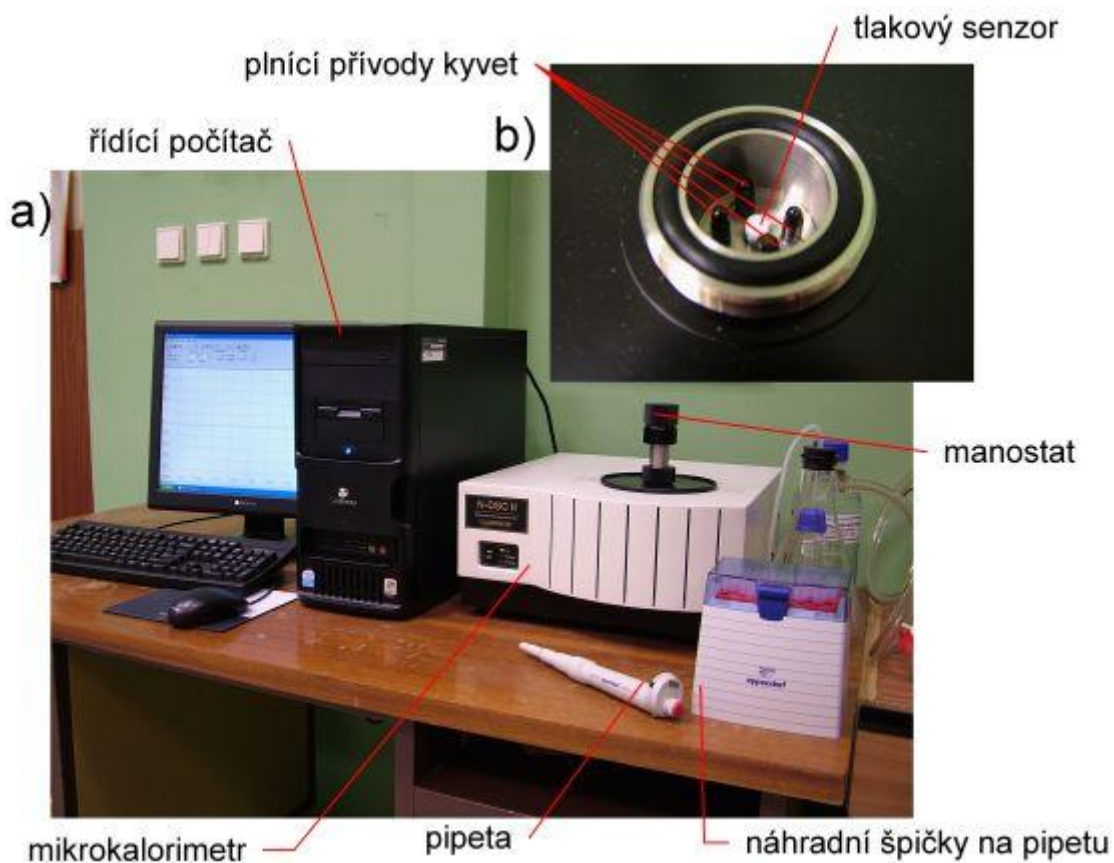
Čas odezvy	poločas = 5 s
Opakovatelnost baseliny	Standardní odchylka $\pm 4 \mu\text{cal}/^\circ\text{C}$ při ohřevu $1^\circ\text{C}/\text{min}$
Šum baseliny	Standardní odchylka $\pm 0,015 \mu\text{W}$
Konstrukce kyvety	Kapilára 24K zlato nebo tantal
Objem vzorkové kyvety	0,299 ml
Objem referenční kyvety	0,298 ml
Rozmezí tlaků v kyvetách	0 – 3 atm
Rozmezí teplot pro skenování	$(-10) - 130^\circ\text{C}$
Rychlost ohřívání	Nastavitelné od 0 do $2^\circ\text{C}/\text{min}$



Obrázek 3.1a: Schéma mikrokalorimetru Nano DSC II. 1 – platinový teploměr; 2 – jednotka kontrolující teplotu; 3 – obvod měřící teplotu; 4 – ohřívací a chladící Peltierovy prvky; 5 – algoritmus řízení teploty; 6, 7 – kyvety; 8 – termosenzor; 9, 10 – topná tělíska vyrovnávajícího příkonu; 11 – plášť; 12 – vyhodnocení a odezva na signál termosenzoru; 13 – datový soubor; 14 – zesilovač signálu; 15 – kompenzační můstek vyrovnávajícího příkonu; 16 – manostat; 17 – tlakový senzor; 18 – měřič tlaku.



Obrázek 3.1b: Detail měřící jednotky kapilárních kyvet. 6, 7 – kapilární kyvety.



Obrázek 3.2: a) mikrokalořimetr Nano-DSC II; b) detail přívodů kvet.



Obrázek 3.3: Odvzdušňovací a promývací zařízení.

4 Použité vzorky

4.1 Vzorky nukleových kyselin

Pro měření byly použity tři vzorky synteticky připravených nukleových kyselin. Dva z použitých vzorků byly komplementární oligonukleotidy se známou posloupností bází, konkrétně se jednalo o nonamery. Třetím vzorkem byly komplementární homopolymery, neboli polynukleotidy obsahující pouze jeden typ báze.

První vzorek byl připraven z DNA 9-meru se složením (5′) GCA TAT CAC (3′) (označení Match9) a komplementárního DNA vlákna se složením (5′) GTG ATA TGC (3′) – (Kompl9). Molekulová váha Match9 je 2682,835 a Kompl9 2753,871. Vzorky byly připraveny a HPLC přečištěny v LFMR Masarykovy Univerzity v Brně. Dodaná molární množství 0,439 μmol a 0,403 μmol .

Druhý vzorek byl tvořen stejnými typy oligonukleotidů, tedy Match9 a Kompl9. V tomto případě byl vzorek syntetizován a přečištěn na PAGE ve vídeňské firmě VBC-Biotech. Tento vzorek byl prvotně určen pro NMR měření (proto jiné složení pufru a přídavek těžké vody – viz dále) a teprve poté byl použit i na mikrokolorimetrické měření.

Třetí vzorek byl tvořen RNA polynukleotidy – polyadenylovou (PolyA) a polyuridylovou (PolyU) kyselinou. Vzorek Poly(A) (draselná sůl) v p.a. čistotě byl od firmy Calbiochem a vzorek Poly(U) (amonná sůl) v p.a. čistotě byl od firmy P-L Biochemicals. U těchto polynukleotidů neznáme přesně délku jednotlivých řetězců. Molekulová váha adenosin monofosfátu je 367,299 a uridin monofosfátu 323,198.

4.2 Použité pufrы

Pro rozpouštění a ředění vzorků byly použity dva typy pufrů. Prvním byl 20 mM fosfátový pufr o pH 7,0 s přídavkem 100 mM NaCl (dále označovaný PBNa). Druhým byl 25 mM TRIS (pH 7,4) s 10% D₂O (označení TB-HW).

4.3 Příprava vzorků

První vzorek byl směsný roztok Match9 a Kompl9 v poměru 1:1, který byl vytvořen smícháním zásobních roztoků oligonukleotidů v PBNa o koncentracích 0,089 mM. Výsledná koncentrace jednotlivých oligonukleotidů (a tedy i vytvořených duplexů) byla 0,0445 mM, to znamená 0,4 mM koncentraci bázových párů.

Druhý vzorek byl připraven obdobným způsobem ze zásobních roztoků o koncentracích 1,83 mM v TB-HW. Výslednou koncentrací 0,91 mM měl vzorek při NMR měření. Pro dosažení potřebného objemu pro naplnění vzorkové kyvety mikrokolorimetru byl vzorek mírně doředěn (opět TB-HW) na 0,57 mM koncentraci. Dále byla provedena dvě měření při dalším ředění vzorku na koncentrace 0,16 mM a 0,0445 mM.

Třetí vzorek byl připraven ze zásobních roztoků PolyA a PolyU v PBNa o koncentracích 0,4 mM v nukleotidech. Jejich koncentrace byla nastavovaná pomocí měřené UV absorpce při 260 nm na spektrometru Lambda12 firmy Perkin-Elmer. Koncentrace vzorku jsme určili podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon c d, \quad (4.1)$$

kde A je absorbance, c je koncentrace, d je tloušťka kyvety (v našem případě $d = 1$ cm), a ε je extinkční koeficient závislý na měřené látce. Pro Poly(A) je $\varepsilon = 12227 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a pro Poly(U) je $\varepsilon = 9713 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ při vlnové délce 260 nm.

Absorbance vzorku se určuje z propustnosti pro monochromatické záření podle vztahu:

$$T = 10^{-A}. \quad (4.2)$$

Po smíchání zásobních roztoků v poměru 1:1 byla výsledná koncentrace básových párů při vytvoření duplexu 0,2 mM.

VÝSLEDKY MĚŘENÍ A JEJICH VYHODNOCENÍ

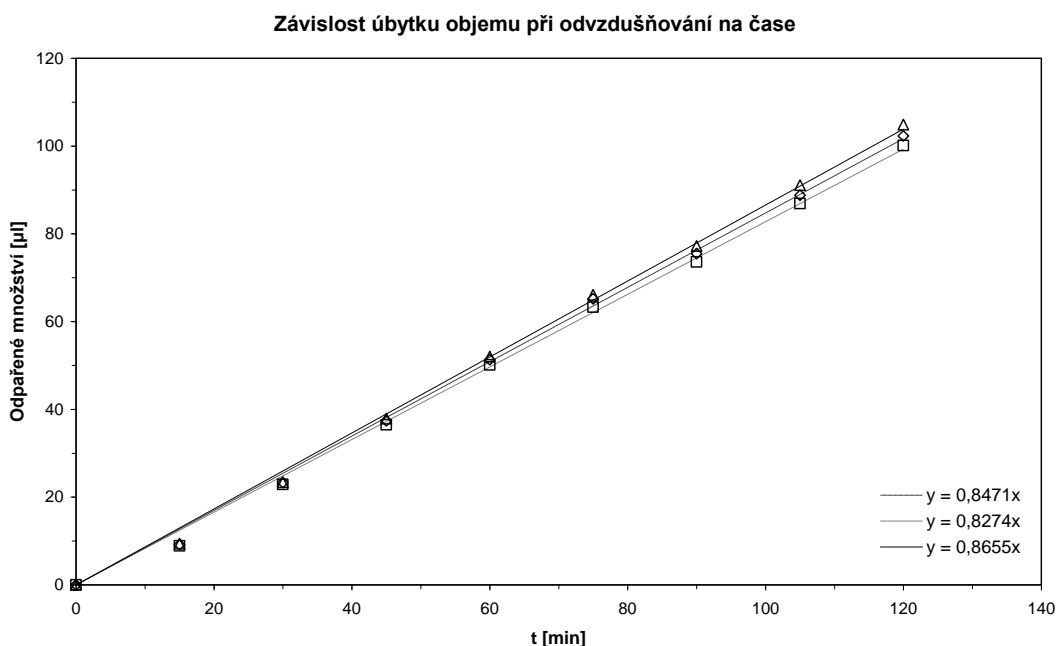
5 Měření na mikrok calorimetru

5.1 Odvzdušňování roztoků před vložením do kalorimetru

Před vložením roztoku do kalorimetru je nutné nejprve provést jeho odvzdušnění. Je to nezbytné k tomu, aby se zamezilo tvorbě bublinek při zahřívání, protože i mikroskopické bublinky mohou zničit celé měření. V záznamu z měření se totiž projeví značnými fluktuacemi udávaného vyrovnávacího tepelného příkonu.

Odvzdušnění jsme prováděli v exsikátoru (hermeticky uzavřené nádobě z organického skla) připojeném na vývěvu, která z něho vyčerpávala vzduch. Roztok je nutné dát do skleněné nádobky (v plastové by se neodvzdušnil) s míchadélkem. K odvzdušnění dojde za současného míchání a odčerpávání vzduchu po dobu přibližně 30 minut.

Pro zjištění vlivu procesu odvzdušňování na zvyšování koncentrace vzorku odparem vody jsme provedli zvláštní měření. Nechali jsme odvzdušňovat samotné rozpouštědlo a každých 15 minut jsme měřili jeho hmotnost na analytických vahách. Celková doba odvzdušňování byla 120 minut. Záznam z tohoto měření demonstruje obrázek 5.1. Procentuální úbytek objemu za hodinu odvzdušňování činí asi 5,5%.



Obrázek 5.1: Závislost úbytku objemu pufru PBNa na době odvzdušňování. Měření bylo opakované třikrát. U všech měření byl počáteční objem 1 ml.

5.2 Plnění kyvet roztokem

Kyvety se plní roztokem pomocí pipety. Na špičku pipety je nutné nasadit malý kousek hadičky, který slouží jako spojka při nasazení na výstupní trubičku kyvety.

Každá kyveta má dva přívody (vstup a výstup). Při plnění se jedna samostatná špička pipety nasadí na výstup a špička s pipetou naplněná roztokem se nasadí na vstup. Roztok se pomalu vypouští do kyvety. Když se hladina objeví v samostatné špičce připevněné na výstup, několikrát rychle zmáčkne a pustíme, abychom roztok promíchali a vytlačili případnou bublinku, která by se mohla v roztoku vytvořit. Toto rychlé zmáčknutí a puštění musíme provést opatrně, abychom si v roztoku spíš nějakou bublinku nevytvořili, je nutné dbát na to, abychom stále viděli hladinu v obou špičkách. Potom palcem utěsníme volnou špičku, rychlým pohybem kolmo vzhůru sejmemе obě špičky najednou, abychom si nevysáli roztok z kyvety. Dále je nutné, aby nám při sejmutí nevystříkl zbytek roztoku ze špiček, protože by mohl znečistit roztok v druhé kyvetě. Po naplnění je nutné nasadit vždy na jeden výstup kyvety čepičku a důkladně osušit prostor okolo výstupů a celý prostor pod manostatem.

Množství nutné ke správnému naplnění kyvety je 600 μl , abychom byli schopni zajistit toto množství, je lepší si vždy připravit 700 μl roztoku.

5.3 Než začne měření vzorku

Při přípravné fázi před měřením vzorku se nejprve obě kyvety kalorimetru naplní stejným rozpouštědlem, jaké používáme k přípravě měřeného vzorku, a nechají se proběhnout dva cykly (tedy jedno ohřátí a jedno ochlazení) v teplotní škále, ve které budeme chtít vzorek měřit. Rychlost ohřevu i chlazení je přitom možné nastavit vyšší než při vlastním měření. Běžně jsme nastavovali tuto rychlost na 2 K/min, což je maximum, které mikrokolorimetr dovoluje. Tato příprava kalorimetru slouží k tzv. „vyžihání“ (conditioning) kyvet, kdy se na stěnách kyvet má vytvořit stabilní povrchová vrstva, která se během vlastního měření již nebude výrazně měnit. Pro tuto proceduru je možné použít i neodvzdušněné rozpouštědlo, ale výrobce doporučuje pro jistotu odvzdušňovat i pro tuto přípravnou fázi. My jsme vždy pracovali s odvzdušněným pufrem.

5.4 Měření vzorku

Po „vyžihání“ kyvet a jejich vyprázdnění nastává vlastní měření. Nejprve obě kyvety opět naplníme rozpouštědlem. Tentokrát je již nutné, aby byl pufř řádně odvzdušněn. Po naplnění uzavřeme plastovou čepičkou vždy jeden ze dvou kapilárních přívodů do každé kyvety a našroubujeme hlavici manostatu (prostor pod ním musí být dokonale suchý, nesmí tam být žádná kapička). Po uzavření chvíli počkáme, abychom viděli, zda se ustálí údaj o vyrovnávacím příkonu, což slouží jako první kontrola, zda nejsou v kyvetách bublinky. Pokud dojde k ustálení, je kalorimetr naplněn dobře a můžeme zvyšovat pomocí manostatu tlak. Obvykle jsme jej nastavovali na hodnotu 3 atm. Opět počkáme na ustálení údaje o příkonu (hodnota v ustáleném stavu by měla být téměř shodná s hodnotou před natlakováním).

Je-li vše v pořádku, zadají se parametry měření – počet cyklů, interval teplot, rychlost ohřívání a chlazení (lze nastavit rozdílné) a směr prvního scanu – ohřívání nebo chlazení (můžeme zvolit, co chceme měřit jako první). Po spuštění měření kalorimetr začne měřit referenční úroveň při scanech rozpouštědlo-rozpouštědlo. Scany z ohřívání a ochlazování by měly být symetrické vůči nule. Vzorek naplníme do kyvety tzv. „on the fly“ (viz další podkapitola). Tento způsob plnění doporučuje výrobce k získání lepších výsledků měření. Scany se vzorkem by rovněž měly být symetrické kolem nuly, pokud v roztoku nedochází k nevratným změnám. Po skončení měření kalorimetr vyrovná teplotu obou kyvet na 25 °C, poté je nutné obě kyvety vyprázdnit a vymýt.

Všechna měření jsme provedli v teplotním rozsahu 5 až 85 °C, rychlost ohřívání i chlazení byla 1 K.min⁻¹ a první směr byl vždy ohřívání. U jednotlivých měření jsme nechali cyklovat 28 scanů (u jednoho měření 26).

5.5 Plnění kyvet vzorkem „on the fly“

Při tomto způsobu plníme kyvetu vzorkem, zatímco kalorimetr neustále měří. Výměnu vzorku za pufr provedeme při ochlazování kyvet (scan, při kterém k výměně dojde, si můžeme zvolit). S výměnou začínáme, když je kalorimetr asi u 30 °C. Zrušíme manostatem přetlak, otevřeme prostor vstupů kyvet a sejmeme čepičku ze vzorkové kyvety. Vysajeme rozpouštědlo z této kyvety a naplníme ji od vzdušněným vzorkem (přitom kalorimetr neustále ochlazuje kyvety). Dále postupujeme stejně jako při předchozím plnění rozpouštědlem – začepičkujeme, uzavřeme prostor vstupů a natlakujeme, přičemž před natlakováním chvíli počkáme na ustálení údaje příkonu (v tomto případě však k úplnému ustálení nedojde, protože tento údaj se plynule mění s tím, jak kalorimetr ochlazuje kyvety). Tuto výměnu vzorku i s natlakováním musíme stihnout před tím, než kalorimetr dosáhne 0 °C (pokud měříme až k nule), protože pokud bychom nestihli natlakování, mohly by roztoky v kapilárních kyvetách zamrznout a tím je zničit. Při plnění „on the fly“ plníme pouze vzorkovou kyvetu, referenční kyveta s rozpouštědlem nemusí být znovu naplněna. Při všech našich měřeních celá procedura výměny pufru za vzorek „on the fly“ trvala vždy okolo 12 minut.

5.6 Vymývání kyvet

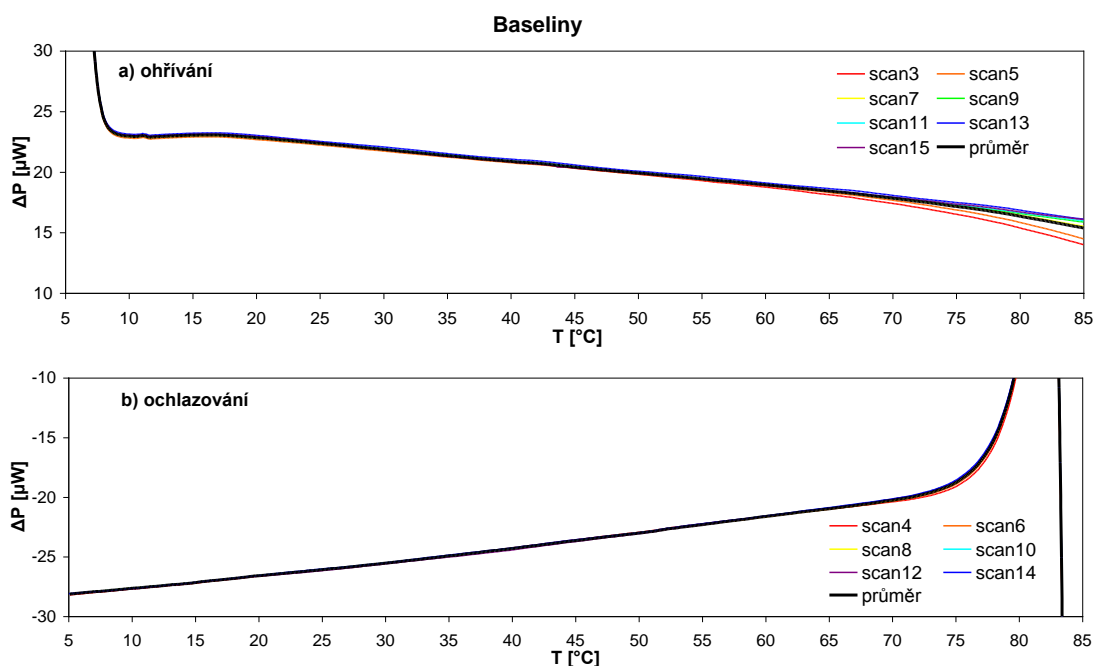
Na konci každého měření po odčerpání vzorku je nutné bezprostředně pečlivě vymýt kyvety, aby nedošlo k usazování látek ze vzorku a z pufru na stěnách kyvet. Mytí se provádí následujícím způsobem: vyprázdněné kyvety opět naplníme 50% kyselinou mravenčí (tu samozřejmě není třeba od vzdušňovat) a nechá se ohřát z teploty 25 °C na teplotu 80 °C. V této fázi se kapilární trubičky nezačepičkovávají, ani se plnicí prostor neuzavírá (kyselina by mohla při ohřívání stříknout do pístu manostatu a způsobit korozi). Když kalorimetr opět vyrovná teplotu kyvet na 25 °C, vysajeme obsah kyvet a necháme přes ně přečerpát 1 l deionizované vody. Všechny plochy, které přišly do styku s kyselinou mravenčí, je rovněž nutné důkladně omýt deionizovanou vodou.

Abychom měli větší jistotu, že jsou kyvety správně vymyté, je lepší tento proces zopakovat ještě jednou. My jsme vždy vymývali kyvety dvakrát.

6 Zpracování výsledků měření a jejich diskuse

6.1 Příprava dat na zpracování

Před samotným zpracováním naměřených dat je nutné si data připravit. Přípravu dat budeme demonstrovat na datech naměřených pro vzorek DNA, který byl původně měřen na NMR, při základní koncentraci (0,57 mM) ředěném TB-HW. Originální záznam z měření jsme uvedli dříve (viz. obr. 2.1). Na obrázku 6.1 jsou baseliny (průběhy ze scanů rozpouštědlo-rozpouštědlo) ve zvláštních grafech pro ohřívání (obr. 6.1a) a pro ochlazování (obr. 6.1b). První scan (scan1 a scan2) jsme úplně vynechali, protože se od ostatních zřetelně lišil. Z obrázku je vidět, že při ohřívání baseliny u vyšších teplot trochu „plavou“, proto jsme pro další zpracování určili baselinu jako aritmetický průměr ze všech na obrázku 6.1 kromě první a druhé (tj. scan3 + scan5 pro ohřívání a scan4 + scan6 pro ochlazování).



Obrázek 6.1: Scany rozpouštědlo-rozpouštědlo (baseliny) pro ohřívání a ochlazování a jejich aritmetický průměr.

V dalším kroku jsme tedy odečetli průměr referenčních scanů (baselin) od scanů se vzorkem. Přímé odečtení se ukázalo jako nejlepší možnost.

Vycházíme z následujícího vztahu:

$$\Delta P = \left[\left[V^{cell} C^{solute} \frac{C_p^{vz}}{MW} + (V^{cell} - V^{vz}) \rho C_s \right] - V^{cell} \rho C_s \right] \frac{dT}{dt}, \quad (6.1)$$

kde V^{cell} je objem kyvety, C^{solute} je koncentrace vzorku v roztoku (v g.l^{-1}), C_p je molární tepelná kapacita vzorku v roztoku, MW je molekulová váha rozpouštěné látky, V^{vz} je celkový objem rozpouštěné látky v kyvetě, ρ je hustota rozpouštědla, C_s je tepelná kapacita na jednotku váhy rozpouštědla. Tento vzorec však předpokládá ideální stejnost

kyvet, tudíž by pro referenční měření rozpouštědlo-rozpouštědlo měl vyjít rozdíl v příkonu nulový ($\Delta P_{rozp} = 0 \text{ W}$). To však nenastává, jak ukazuje obrázek 6.1. Při měření ΔP_{rozp} vychází poměrně vysoké hodnoty. To lze přičíst nestejnému objemu vzorkové a referenční mikrokyvety [Privalov, 2005]. Pak tedy vzorec (6.1) přepíšeme jako:

$$\Delta P = \left[\left[V_{vz}^{cell} c^{vz} C_p^{vz} + (V_{vz}^{cell} - V^{vz}) \rho C_s \right] - V_{ref}^{cell} \rho C_s \right] \frac{dT}{dt}, \quad (6.2)$$

kde V_{vz}^{cell} (V_{ref}^{cell}) je objem vzorkové (referenční) kyvety a c^{vz} je molární koncentrace vzorku. Pak pro ΔP_{rozp} dostáváme z (6.2) vztah:

$$\Delta P_{rozp} = (V_{vz}^{cell} - V_{ref}^{cell}) \rho C_s \frac{dT}{dt}. \quad (6.3)$$

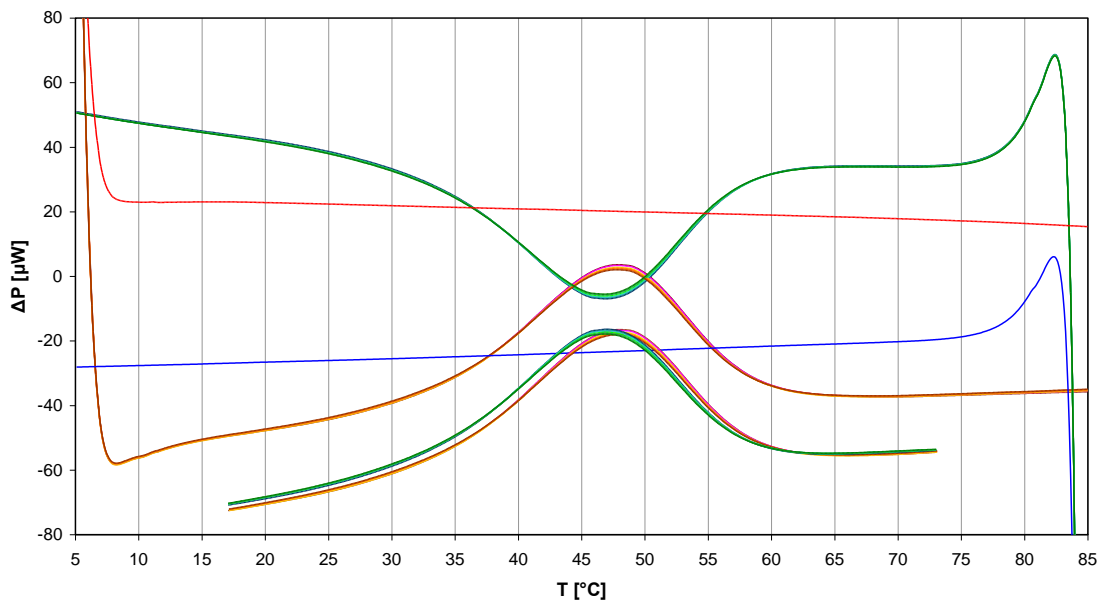
Při odečtení referenčního scanu od scanu se vzorkem dostaneme ze vztahů (6.2) a (6.3) výsledný vztah:

$$\Delta P - \Delta P_{rozp} = \left[V_{vz}^{cell} c^{vz} C_p^{vz} + V^{vz} \rho C_s \right] \frac{dT}{dt}, \quad (6.4)$$

kde člen $V^{vz} \rho C_s$ neznáme, ale můžeme předpokládat jeho lineární závislost na teplotě.

Nakonec bylo potřeba v rámci přípravy dat omezit interval teplot, aby se z dalšího zpracování vyloučily deformace teplotního průběhu signálu kvůli „zakmitům“ v průběhu vyrovnávacího příkonu v krajních částech měřeného intervalu teplot. Tento průběh se vyskytuje vždy na začátku každého scanu, kdy kalorimetr začíná ohřívat (nebo chladit) kyvety a souvisí patrně s přechodem režimu kalorimetru z teplotně ustáleného stavu do stavu plynulé lineární teplotní změny. Pro další zpracování byl tedy vybírán interval 17 až 73 °C. Příprava dat je ilustrována na obrázku 6.2.

Příprava dat



Obrázek 6.2: Ilustrace přípravy dat. V oranžových odstínech jsou data pro ohřívání a v zelených pro ochlazování. Kromě naměřených průběhů shodných s průběhy na obrázku 2.1. jsou nakreslené i výsledné průběhy určené pro další zpracování. Baseliny (červeně a modře) v tomto obrázku jsou již průměrem z naměřených dat.

6.2 Možné přístupy k analýze dat

Nabízí se několik možností jak naměřená data zpracovat. My jsme na jednom průběhu (vzorek DNA s koncentrací 0,57 mM, ohřívání) vyzkoušeli sedm různých přístupů k vyhodnocování, a potom vybrali tři postupy, které dávaly rozumné a fyzikálně správně zdůvodnitelné výsledky. Zde postupně probereme všech sedm přístupů. První tři přístupy přímo fitují průběh scanů. Další tři jsou od nich odvozeny, jedná se o kombinaci fitu a přímé integrace. V tomto případě se fit použije pouze pro určení profilu pozadí a termodynamické parametry se určují přímou integrací přebytku signálu („excess heat capacity“). Poslední možností je integrace bez použití modelu, kde se pozadí aproximuje polynomem.

Při fitování vycházíme z jednoduchého dvoustavového modelu. Dvoustavový model předpokládá přechod mezi duplexy a samostatnými řetězci bez mezistavu. Tento přechod je spojen se změnou molární entalpie o ΔH a změnou entropie o ΔS . Během přechodu se postupně mění i koncentrace jednotlivých složek v roztoku, tedy koncentrace duplexů c^{du} a koncentrace volných vláken c^{ss} . Koncentrací volných vláken samozřejmě myslíme koncentraci jednoho druhu volných vláken. V roztoku se jejich koncentrace mění podle vztahu $c^{ss} = c^{vz} - c^{du}$, kde c^{vz} je koncentrace roztoku vzorku v duplexech. Vztah (6.4) tedy přepíšeme do tvaru:

$$\Delta P - \Delta P_{rozp} = \left[V_{vz}^{cell} \left(c^{du} C_p^{du} + c^{ss} [C_p^{ss1} + C_p^{ss2}] + \Delta H \frac{dc^{du}}{dT} \right) + V^{vz} \rho C_s \right] \frac{dT}{dt}, \quad (6.5)$$

kde C_p^{du} , C_p^{ss1} , C_p^{ss2} jsou molární tepelné kapacity duplexu, jednoho a druhého typu volných vláken. Při fitování jsme předpokládali lineární závislost všech (tedy i C_s) molárních tepelných kapacit na teplotě. Nejprve jsme předpokládali molární tepelné kapacity teplotně nezávislé, ale tento předpoklad se ukázal jako nedostatečný.

Rovnovážnou konstantu, definovanou vztahem (1.2), určuje poměr koncentrací duplexů a volných vláken (platí za podmínky, že se jedná o směsný vzorek s poměrem obou typů volných vláken 1:1):

$$K(T) = \frac{c^{du}}{c^{ss1} c^{ss2}} = \frac{c^{du}}{(c^{vz} - c^{du})^2}. \quad (6.6)$$

Koncentraci duplexů můžeme tedy určit jako kořen kvadratické rovnice:

$$c^{du} = c^{vz} - \frac{-1 + \sqrt{1 + 4Kc^{vz}}}{2K}. \quad (6.7)$$

Dále využijeme van't Hoffovu rovnici pro dvoustavový model a vyjádříme z ní rovnovážnou konstantu:

$$K(T) = \frac{1}{c^{H_2O}} \exp\left(-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right), \quad (6.8)$$

kde $c^{H_2O} = 55,5$ M.

S použitím vztahů (6.7) a (6.8) určíme derivaci koncentrace duplexů podle teploty:

$$\frac{dc^{du}}{dT} = -\frac{-1 - 2Kc^{vz} + \sqrt{1 + 4Kc^{vz}}}{2K\sqrt{1 + 4Kc^{vz}}} \frac{\Delta H}{RT^2}. \quad (6.9)$$

Fit1. První možnost fitování naměřených dat je fitovat podle vztahu (6.5) s využitím vztahů (6.7), (6.8), (6.9). Výsledný vztah, podle kterého bylo fitování provedeno, je:

$$\Delta P - \Delta P_{rozp} = (A_0 + A_1 T)c^{du} + (B_0 + B_1 T)(c^{vz} - c^{du}) + D_0 \frac{dc^{du}}{dT}. \quad (6.10)$$

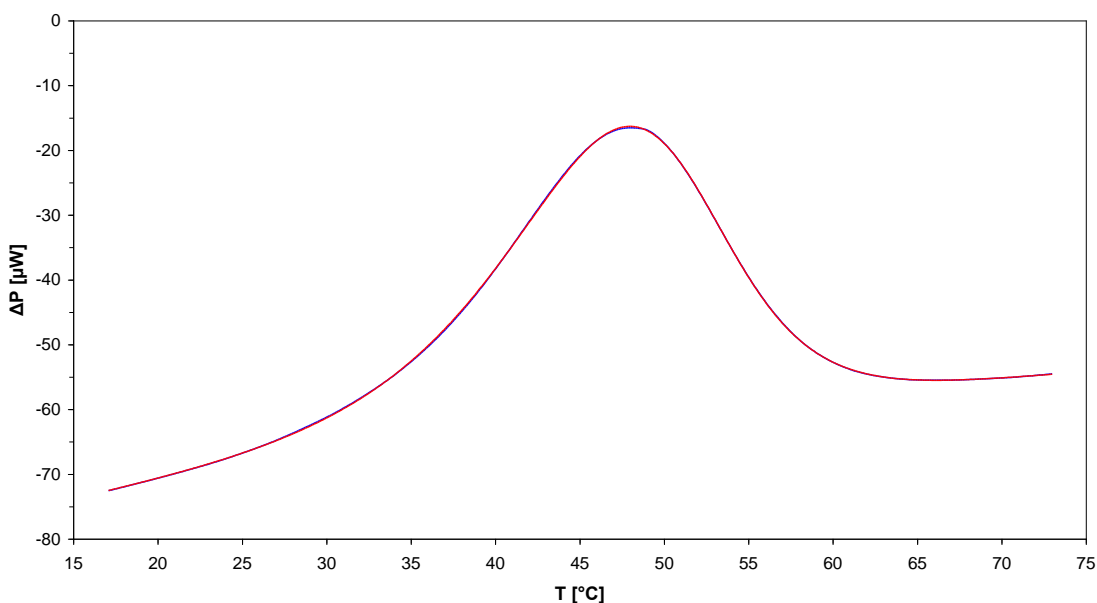
Při tomto zpracování se fitovalo 7 volných parametrů: $A_0, A_1, B_0, B_1, D_0, \Delta H, \Delta S$. Dva z nafitovaných parametrů jsou úměrně změně entalpie. Parametr ΔH je přímo změna entalpie a parametr D_0 je změně entalpie úměrný přes konstantu danou vztahem:

$$D_0 = V_{vz}^{cell} \Delta H \frac{dT}{dt}, \quad (6.11)$$

kde $\frac{dT}{dt}$ je rychlost ohřívání (ochlazování). Při měření vzorku byla rychlost $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1} = 0,0167 \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$.

Nafitovaný průběh se velmi dobře shoduje s naměřenými experimentálními daty. Experimentální křivka i s fitem je na obrázku 6.3. Ačkoliv nafitovaný průběh „sedí“ skvěle, tak tento fit není uspokojivý, protože entalpie nafitované ve dvou nezávislých parametrech (D_0 a ΔH) nespĺňují vztah (6.11). Tento nesoulad může mít několik příčin. Buď neplatí úplně přesně použitý model, nebo není správně určena koncentrace a nebo je průběh scanu zdeformovaný průběhem pozadí, které není pouze lineární.

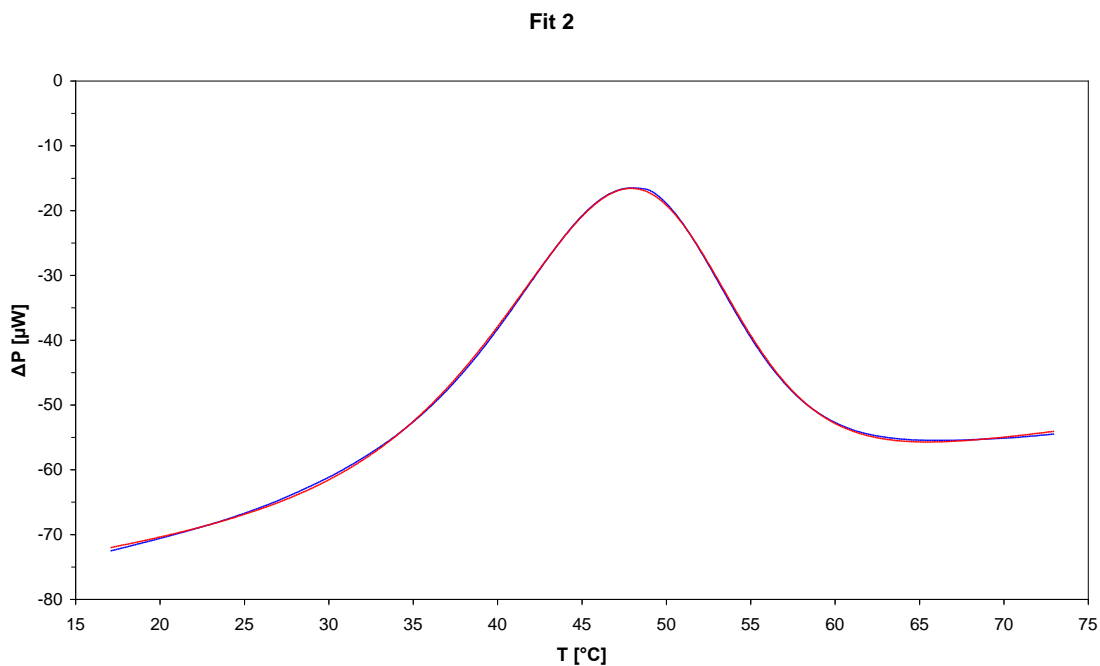
Fit 1



Obrázek 6.3: Fit 1. Na obrázku jsou naměřená data (modrá křivka) a nafitovaný průběh (červená křivka).

Fit2. Druhou možností je, že zavedeme fixní vazbu mezi parametry D_0 a ΔH podle vztahu (6.11). Tím se nám snížil počet volných parametrů na 6 ($A_0, A_1, B_0, B_1, \Delta H, \Delta S$).

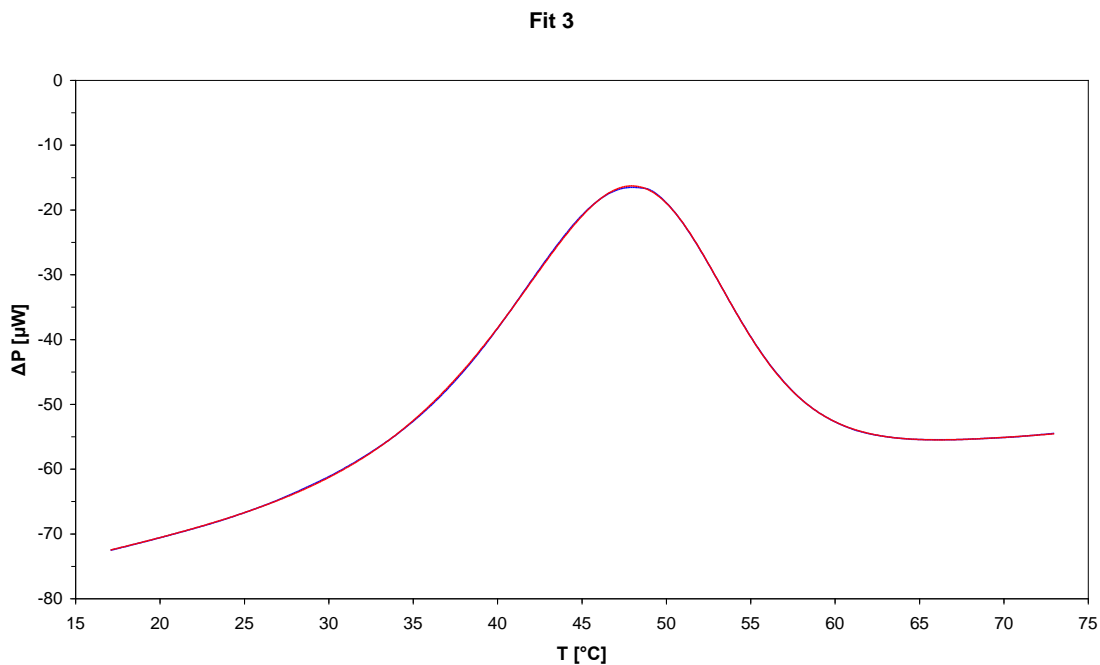
U tohoto fitu je shoda s experimentálními daty horší než u Fitu1, ale procedura jednoznačně konverguje.



Obrázek 6.4: Fit 2. Na obrázku jsou naměřená data (modrá křivka) a nafitovaný průběh (červená křivka).

Fit3. Pokud připustíme možnost, že koncentrace vzorku nebyla určena dostatečně přesně, lze fitovat tak, že vezmeme koncentraci jako proměnný parametr. Tuto možnost jsme zkusili ve Fitu3.

Fitovali jsme tedy opět podle rovnice (6.10) se 7 volnými parametry: A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , c^{vz} , ΔH , ΔS .



Obrázek 6.5: Fit 3. Na obrázku jsou naměřená data (modrá křivka) a nafitovaný průběh (červená křivka).

U tohoto fitu je shoda s experimentálními daty stejně dobrá jako u Fitu1 (viz. obr. 6.5). Ovšem koncentrace vzorku daná volným parametrem c^{vz} se poměrně značně posunula oproti naší změřené koncentraci. Hodnota parametru je 0,46 mM a naší

stanovená koncentrace je 0,57 mM. Tato neshoda je příliš velká, abychom mohli dojít k závěru, že tímto postupem lze zpřesnit údaj o koncentraci roztoku. Při budoucích měřeních na mikrok calorimetru bude zřejmě nutné vždy ověřit koncentraci vzorku pomocí UV absorpce.

Fit4, Fit5 a Fit6. Další možností je použít výše uvedené fity pouze k určení průběhu pozadí daného vztahem:

$$\Delta P_{bas} = (A_0 + A_1 T)c^{du} + (B_0 + B_1 T)(c^{vz} - c^{du}). \quad (6.12)$$

Pro získání termodynamických parametrů je nutné jeho odečtení od vztahu (6.10):

$$\Delta\Delta P = \Delta P - \Delta P_{rozp} - \Delta P_{bas}. \quad (6.13)$$

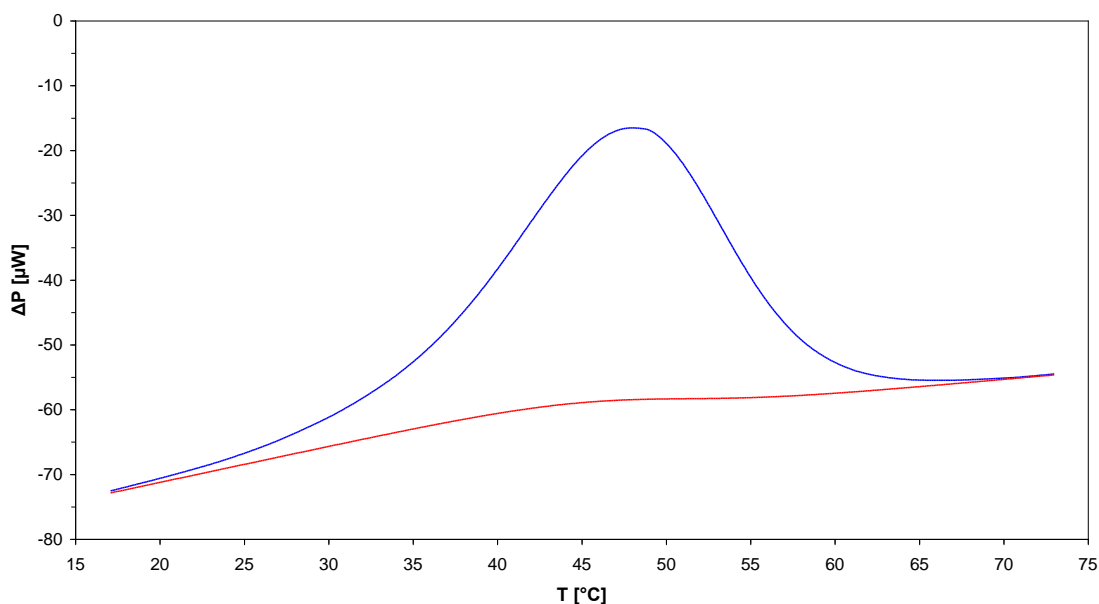
Termodynamické parametry nyní lze určit přímou integrací. Vztahy pro změnu entalpie a entropie jsou:

$$\Delta H = \frac{1}{V_{vz}^{cell} c^{vz}} \frac{dT}{dt} \int \Delta\Delta P(T) dT, \quad (6.14)$$

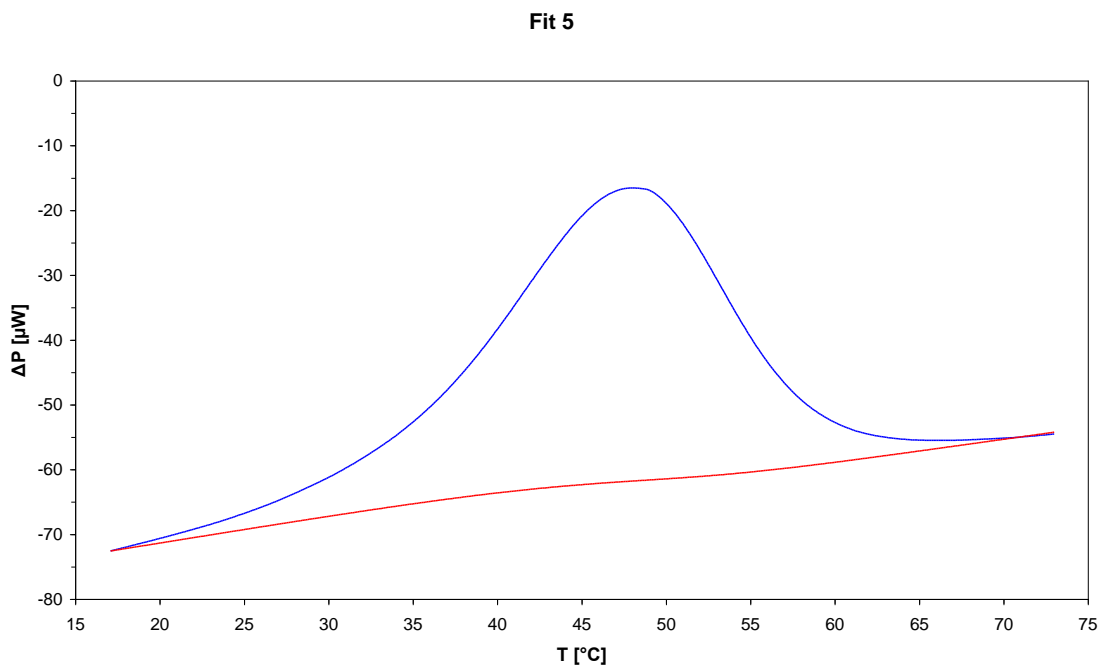
$$\Delta S = \frac{1}{V_{vz}^{cell} c^{vz}} \frac{dT}{dt} \int \frac{\Delta\Delta P(T)}{T} dT. \quad (6.15)$$

Obrázky 6.6, 6.7 a 6.8 ukazují pořadě průběh pozadí získaný z fitů Fit1, Fit2 a Fit3. Po odečtení pozadí byly přímou integrací podle vztahů (6.14) a (6.15) určeny hodnoty ΔH a ΔS uvedené v tabulce 6.1.

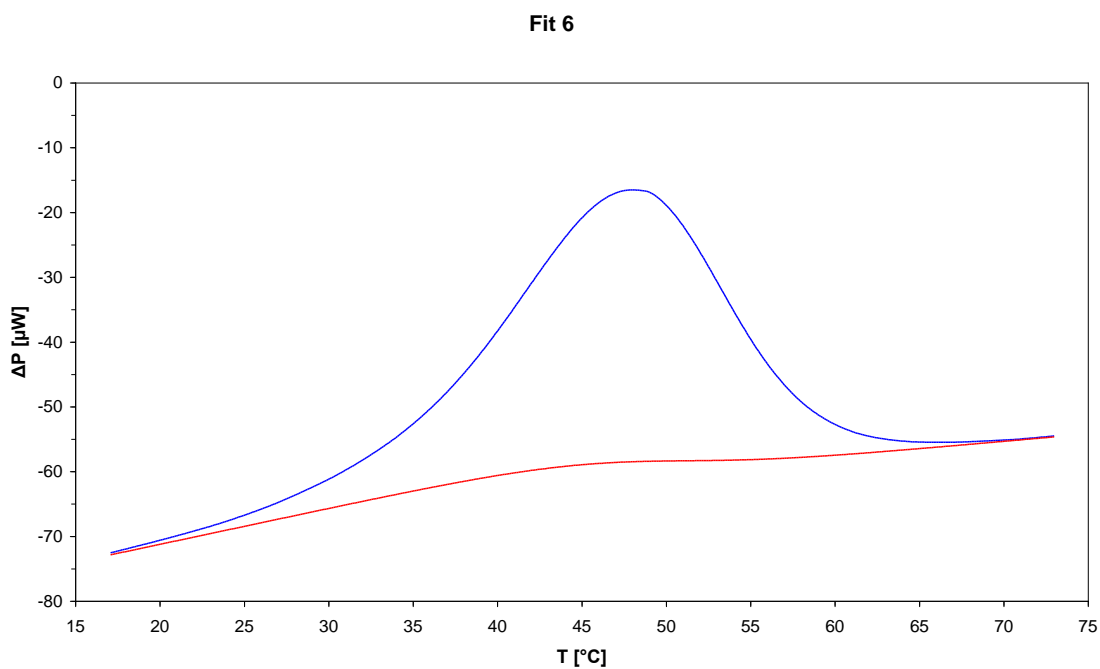
Fit 4



Obrázek 6.6: Fit 4. Na obrázku jsou naměřená data (modrá křivka) a nafitovaný průběh pozadí (červená křivka) z Fit1.



Obrázek 6.7: Fit 5. Na obrázku jsou naměřená data (modrá křivka) a naitovaný průběh pozadí (červená křivka) z Fit2.

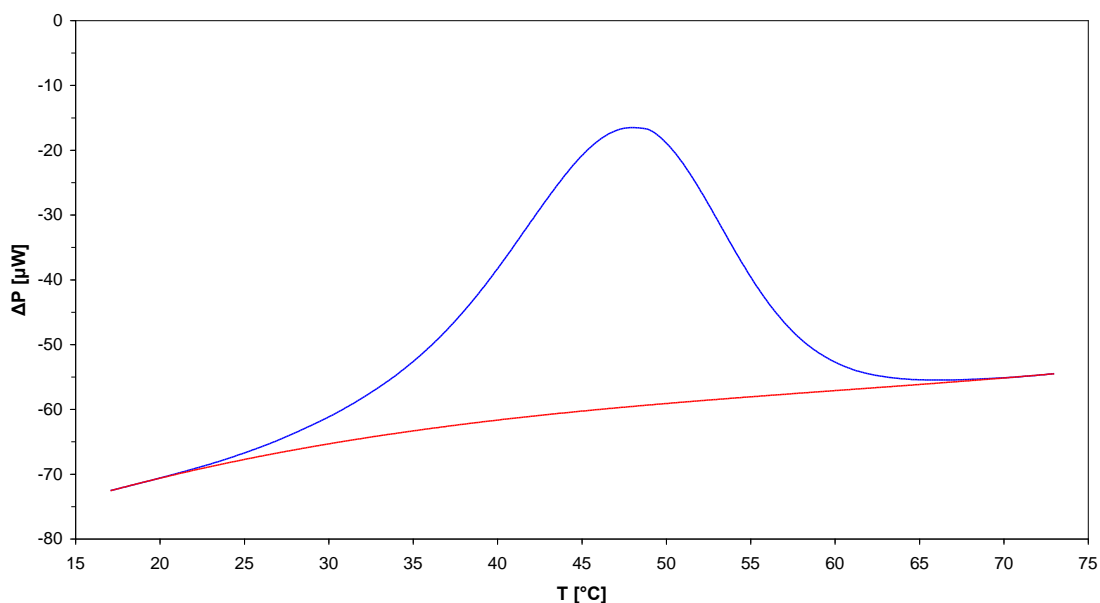


Obrázek 6.8: Fit 6. Na obrázku jsou naměřená data (modrá křivka) a naitovaný průběh pozadí (červená křivka) z Fit3.

Fit7. Nakonec jsme se rozhodli určit pozadí bez použití termodynamického modelu. Aproximovali jsme jej jednoduchou kubickou funkcí. K fitování bylo vybráno 30 bodů z počátku experimentální křivky a 30 bodů z konce. Naitovaná křivka pozadí spolu s experimentální křivkou jsou na obrázku 6.9.

Termodynamické parametry jsme určili, stejně jako v případě Fitů 4, 5, 6, odečtením pozadí od experimentálních dat a následnou přímou integrací.

Fit 7



Obrázek 6.9: Fit 7. Na obrázku jsou naměřená data (modrá křivka) a polynomiální pozadí (červená křivka).

Tabulka 6.1: Hodnoty nařítovaných termodynamických parametrů, které poskytly jednotlivé přístupy, pro vzorek 9-meru DNA z NMR při koncentraci 0,57 mM. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty získané z hodnot jednotlivých scanů i se statistickou chybou počítanou jako standardní deviace pro všechny scany.

	ΔH [kcal.mol ⁻¹]		ΔH [kcal.mol ⁻¹] z D_0		ΔS [cal.K ⁻¹ .mol ⁻¹]	
Fit1	-71,2	0,2	-58,1	1,2	-198,5	0,5
Fit2	-66,8	0,4			-184,9	1,1
Fit3	-71,3	0,2			-198,2	0,6
Fit4	-57,9	1,2			-181,5	3,7
Fit5	-66,5	0,4			-208,7	1,2
Fit6	-71,0	0,2			-222,3	0,6
Fit7	-58,6	1,0			-183,7	3,2

V tabulce 6.1 jsou uvedeny výsledné hodnoty (průměrné hodnoty ze všech scanů) termodynamických parametrů, které nám poskytly jednotlivé přístupy popsané výše (Fit1 – Fit7). Z tabulky je patrné, že postupy Fit4 a Fit6 dávají stejné hodnoty změny entalpie jako Fit1 (změna entalpie určená z D_0) a Fit3, od kterých jsou odvozeny. Postup Fit1 je ovšem nezdůvodnitelný, protože pro změnu entalpie poskytuje dvě různé hodnoty, a z Fitu3 vychází koncentrace vzorku příliš odlišná od koncentrace, kterou byla připravena, proto jsme rozhodli o vyloučení postupů Fit1, Fit3, Fit4 a Fit6. Naměřená data budeme tedy zpracovávat přístupy Fit2, Fit5 a Fit7.

6.3 Výsledky zpracování dat

Všechny vzorky DNA (tedy nonamery) byly zpracovány pomocí vybraných tří způsobů zpracování, tedy Fit2, Fit5 a Fit7. U vzorku PolyA/PolyU bylo vyhodnocení provedeno pouze s použitím přístupu Fit7, protože tvar průběhu vyrovnávacího příkonu zcela zřejmě neodpovídal jednoduchému dvoustavovému modelu. U všech měření byla zpracována data naměřená při ohřívání i při ochlazování vzorku. U všech scanů byly určeny hodnoty termodynamických parametrů ΔH , ΔS a teplota tání. Teplotu tání lze u Fitu2 určit přímo z van't Hoffovy rovnice, kdy pro teplotu tání dostáváme vztah:

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S - R \ln \left[\frac{2c^{H_2O}}{c^{vz}} \right]}. \quad (6.16)$$

V případě přístupů Fit5 a Fit7 jsme určili teplotu tání jako horní mez v integrálu:

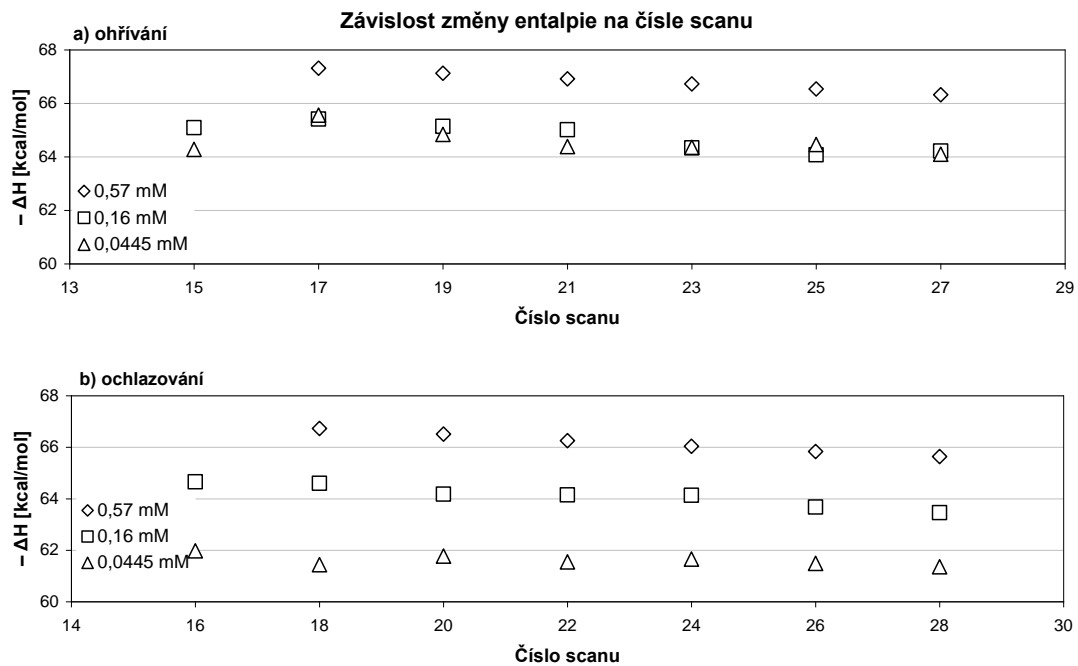
$$\Delta H' = \frac{1}{V_{vz}^{cell} c^{vz}} \int \frac{dT}{dt} \Delta \Delta P(T) dT, \quad (6.17)$$

kde $\Delta H'$ je polovina maximální hodnoty změny entalpie. Výsledky jsou prezentovány v tabulkách 6.2 – 6.5.

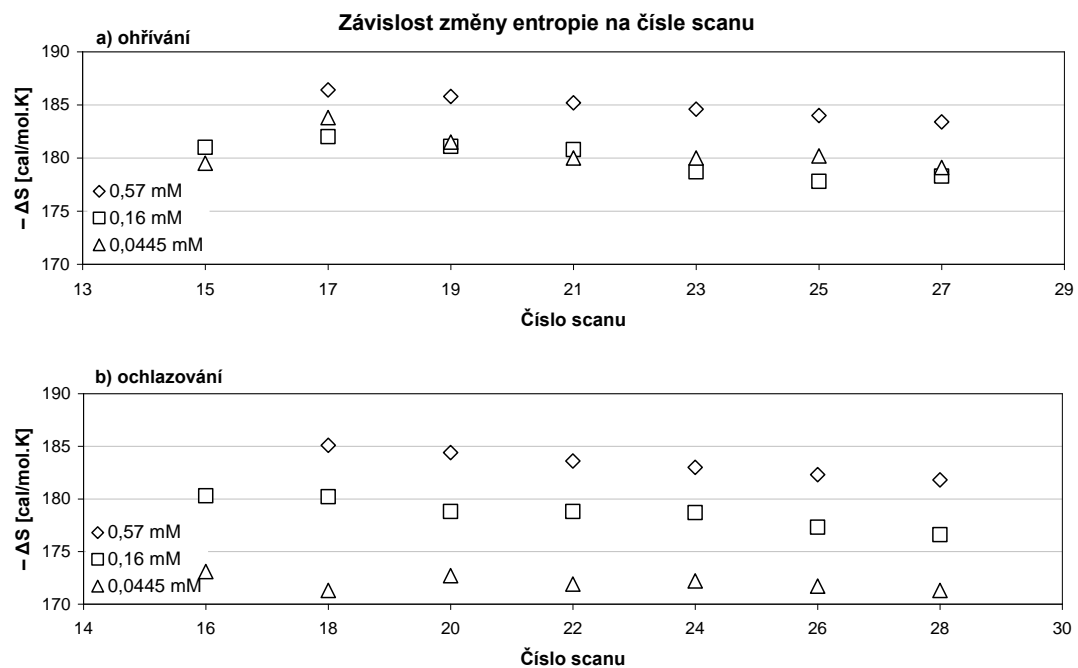
6.4 Jeden vzorek v různých koncentracích

Rozpad a opětovnou tvorbu duplexů ve vzorku komplementárních nonamerů DNA (původně určeného pro NMR, rozpouštědlo TB-HW) při ohřívání a ochlazování jsme proměřili ve třech různých koncentracích. Předpokládali jsme, že změna koncentrace by se neměla projevit na termodynamických parametrech přechodu při použití stejného typu vzorku a složení rozpouštědla. Protože se jedná o vratný děj, neměly by se tyto hodnoty lišit ani v tom, zda jde o ohřívání, či o ochlazování. Naopak na teplotě tání by se ředění projevit mělo, což plyne ze vzorce (6.16) pro vypočítání teploty tání při fitování postupem Fit2.

Nejprve jsme zpracovali každý scan zvlášť metodou Fit2. Termodynamické parametry a jejich závislost na pořadí scanu je vynesena v obrázku 6.10 pro entalpii a 6.11 pro entropii. U ohřívání je pro základní koncentraci vzorku patrný jistý trend, se kterým entalpie i entropie vzrůstá se vzrůstajícím číslem scanu, u nižších koncentrací se tento trend postupně vytrácí. Pro ochlazování je trend dobře patrný i u nižších koncentrací. Dále jsme ze všech hodnot určili průměrné hodnoty entalpie a entropie a jejich statistickou přesnost. Takto jsme experimentální data zpracovali i pro přístupy popsané výše jako Fit5 a Fit7. Výsledky průměrných hodnot termodynamických parametrů učených těmito třemi způsoby jsou uvedeny v tabulce 6.2. V tabulce jsou dále uvedeny i vypočítané teploty tání.



Obrázek 6.10: Závislost změny entalpie určené metodou Fit2 na pořadí scanu pro všechny tři koncentrace vzorku 9-meru DNA (TB-HW).



Obrázek 6.11: Závislost změny entropie určené metodou Fit2 na pořadí scanu pro všechny tři koncentrace vzorku 9-meru DNA (TB-HW).

Hodnoty uvedené v tabulce 6.2 jsme zpracovali graficky na obrázcích 6.12, 6.13 a 6.14, aby bylo lépe vidět, že zatímco Fit2 dává správné hodnoty (podle předpokladu, že termodynamické parametry nezávisí na koncentraci vzorku v měřeném roztoku), zbylé dva fity jsou horší. Malé odchylky pro různé koncentrace u Fitu2 lze připsat nepřesnostem při ředění vzorku, případně malé změně v koncentraci při odvzdušňování vzorku. U Fitu5 se nepřesnosti projevují hlavně u malých koncentrací. Nejhorší výsledky jsme získali u Fitu7, kde jsou rozdíly obrovské. Zde to je patrně dáno hlavně tím, že jsme nepoužili žádný model pro určení pozadí a proložili je pouze polynomiální funkcí.

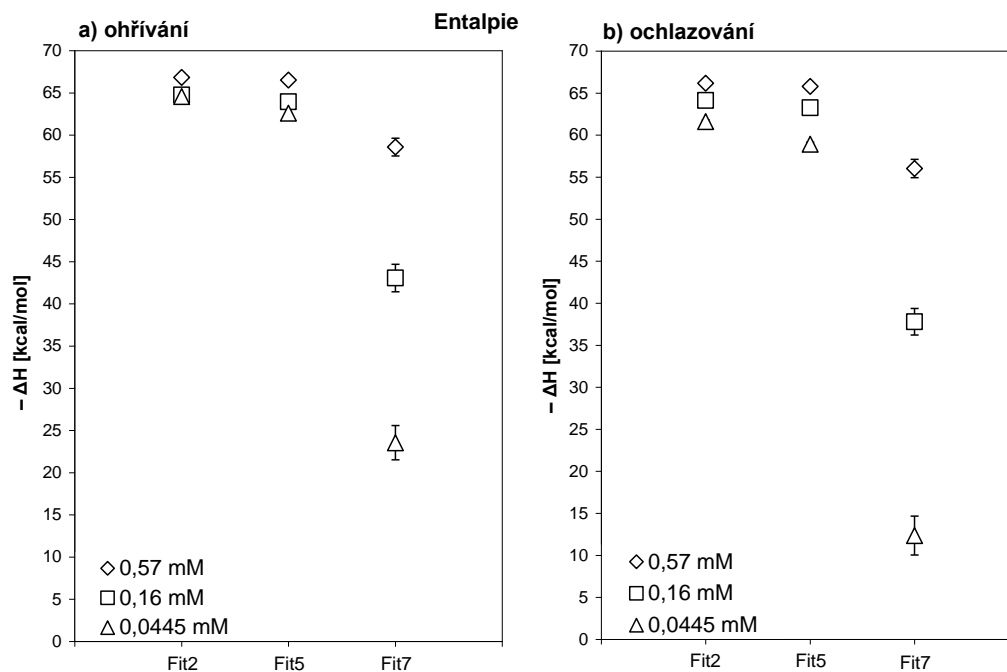
Tabulka 6.2: Tabulka vypočítaných hodnot termodynamických parametrů a teploty tání (zvlášť pro ohřívání a ochlazování) i se statistickou chybou počítanou jako standardní deviace pro všechny scany při daném režimu měření pro vzorek 9-meru DNA ve třech koncentracích.

	Fit2		Fit5		Fit7	
0,57mM – ohřívání						
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-66,8	0,4	-66,5	0,4	-58,6	1,0
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-184,9	1,1	-208,7	1,2	-183,6	3,2
T_m [°C]	46,43	0,04	46,38	0,06	46,46	0,08
0,57mM – ochlazování						
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-66,2	0,4	-65,8	0,5	-56,0	1,1
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-183,4	1,3	-206,9	1,4	-176,1	3,4
T_m [°C]	45,64	0,06	45,57	0,08	45,56	0,06
0,16mM – ohřívání						
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-64,8	0,5	-63,9	0,6	-43,1	1,6
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-180,0	1,6	-204,5	1,8	-137,5	5,1
T_m [°C]	40,16	0,10	40,16	0,09	40,59	0,12
0,16mM – ochlazování						
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-64,1	0,4	-63,2	0,5	-37,8	1,6
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-178,7	1,4	-202,9	1,4	-121,4	5,0
T_m [°C]	39,01	0,07	39,04	0,08	39,11	0,14
0,0445mM – ohřívání						
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-64,6	0,5	-62,6	0,5	-23,5	2,9
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-180,6	1,6	-203,6	1,6	-77,4	9,1
T_m [°C]	34,52	0,10	34,69	0,11	34,13	0,50
0,0445mM – ochlazování						
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-61,6	0,2	-58,9	0,3	-12,4	2,3
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-172,0	0,7	-192,4	0,8	-42,5	7,2
T_m [°C]	32,90	0,16	33,20	0,17	29,99	0,74

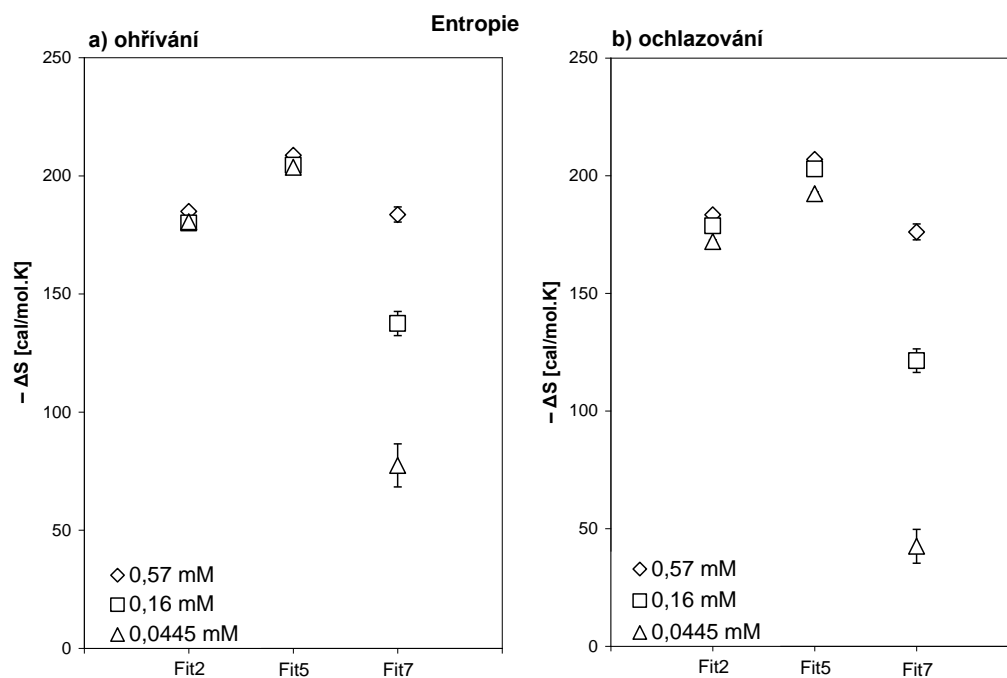
Zatímco v určených hodnotách entalpie a entropie se použité postupy mezi sebou výrazně liší, zejména pro nízké koncentrace, vypočítaná teplota tání je pro Fity2 a 5 prakticky stejná a teplota tání vypočítaná z Fitu7 se od nich poněkud liší jen v případě nejnižší koncentrace (viz obr.6. 14).

Na obrázcích 6.12, 6.13 a 6.14 je rovněž možné si všimnout, že fity dávají pro ohřívání a ochlazování téměř stejné výsledky při nejvyšší koncentraci, při nižších koncentracích se rozdíl zvětšuje. Rozdíl se zvětšuje s klesající koncentrací, což může ukazovat na systematickou chybu způsobenou vyšším zakřivením pozadí v teplotním oboru na začátku scanu, tedy u nízkých teplot při ohřívání a u vysokých teplot při

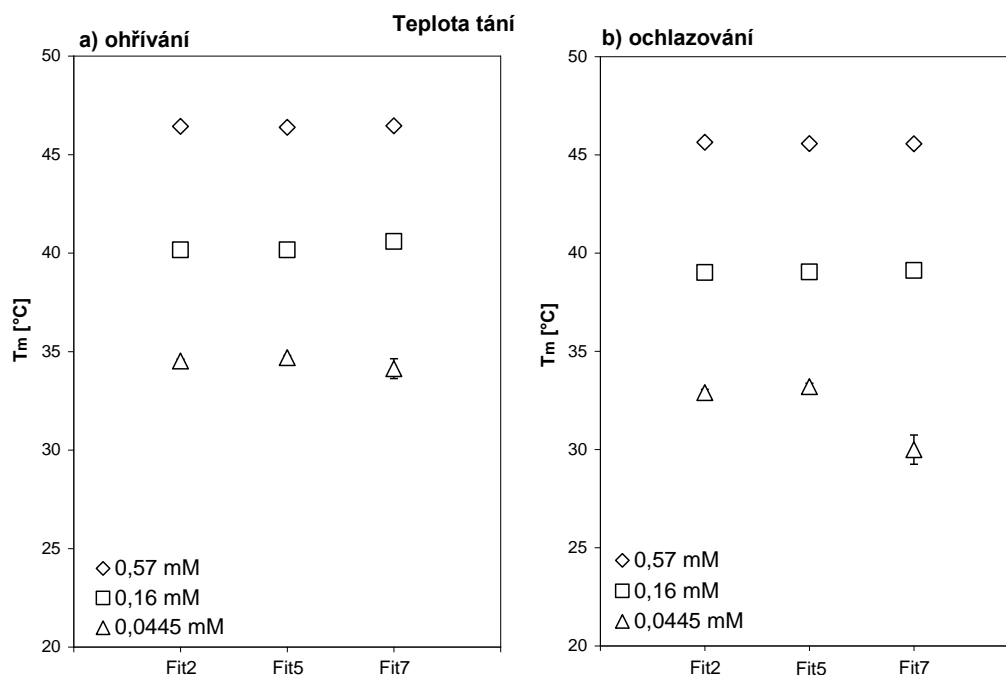
chlazení. Tato chyba je absolutní, takže vede k různě velké relativní chybě při různých koncentracích.



Obrázek 6.12: Závislost průměrné změny entalpie získané třemi metodami pro ohřívání i pro ochlazování pro všechny tři koncentrace vzorku 9-meru DNA (TB-HW).



Obrázek 6.13: Závislost průměrné změny entropie získané třemi metodami pro ohřívání i pro ochlazování pro všechny tři koncentrace vzorku 9-meru DNA (TB-HW).



Obrázek 6.14: Závislost průměrné teploty tání získané třemi metodami zpracování výsledků pro ohřívání i pro ochlazování pro všechny tři koncentrace vzorku 9-meru DNA (TB-HW).

U Fitu2 jsme rovněž vypočítali u všech koncentrací odmocninu ze součtu čtverců odchylek pro jednotlivé scany. Tato veličina udává chybu fitu a je přímo úměrná šumu, pokud je odpovědný za rozdíly mezi experimentem a fitem. Je dobré všimnout si, jak tato veličina klesá s klesající koncentrací, protože užitečný signál by měl zhruba odpovídat koncentraci vzorku. Tedy když naše koncentrace klesá v poměru 1:0,28:0,078 a průměrná hodnota odmocniny ze součtu čtverců odchylek klesá v poměru 1:0,3:0,08, tedy přibližně úměrně signálu, je vidět, že zdrojem této veličiny není šum, ale systematický rozdíl fitu a experimentálních dat, který je úměrný signálu. Šum by měl totiž klesat jako odmocnina ze signálu. Z toho vyplývá, že můžeme předpokládat, že při dalších měřeních bude možné používat ještě nižší koncentrace, aniž by se zásadně zhoršila přesnost výsledků (při zpracování postupem Fit2).

Tabulka 6.3: Tabulka odmocnin ze součtu čtverců odchylek pro jednotlivé scany vzorku DNA (TB-HW) vypočítané pro Fit2.

a) ohřívání	odmocnina ze součtu čtverců odchylek						
Číslo scanu	15	17	19	21	23	25	27
0,57mM		5,80	6,17	6,47	6,82	7,19	7,59
0,16mM	2,87	2,84	2,64	2,44	2,95	2,81	2,84
0,0445mM	0,57	0,48	0,73	0,58	0,71	0,56	0,57
b) ochlazování	odmocnina ze součtu čtverců odchylek						
Číslo scanu	16	18	20	22	24	26	28
0,57mM		5,67	6,04	6,34	6,71	7,06	6,90
0,16mM	2,22	2,26	2,14	2,22	2,23	2,21	2,23
0,0445mM	0,28	0,44	0,44	0,32	0,37	0,37	0,41

Z tabulky 6.3 je zřetelně vidět zhoršování přesnosti fitu s pořadovým číslem scanu. To může souviset s kolísáním pozadí. Čím je větší časová odlehlost mezi měřeními baseliny a měřeními vzorku, tím jsou chyby pozadí větší. U nižších koncentrací

již není tato tendence jasně zřetelná, protože se zde zřejmě uplatňují více i další zdroje chyb.

6.5 Dva vzorky o stejné koncentraci

Dva vzorky se stejnou sekvencí bází jsme naředili různými rozpouštědly. Jeden vzorek (původně použitý při NMR měřeních) byl naředěn TB-HW a druhý PBNa. Oba vzorky měly stejnou koncentraci 0,0445 mM. Ačkoliv bychom mohli očekávat, že teploty tání se budou shodovat, vzhledem k tomu že šlo o stejné vzorky se stejnou koncentrací, tak se jejich teplota tání značně odlišuje (viz tabulka 6.4). Příčina rozdílných hodnot je ve složení rozpouštědla. V případě vzorku z NMR rozpouštědlo (TB-HW) neobsahovalo žádné soli, na rozdíl od druhého vzorku, kde součástí rozpouštědla bylo 100 mM NaCl. Přítomnost kationtu duplex stabilizuje a tím zvyšuje i jeho teplotu tání, proto má vzorek ředěný PBNa vyšší teplotu tání než vzorek ředěný TB-HW.

Hodnoty entropie a entalpie určené postupy Fit2 a Fit5 jsou při ohřívání v rámci chyb shodné, pro ochlazování se trochu liší. Při zpracování postupem Fit7 jsou hodnoty opět nižší než u ostatních přístupů.

Pokud porovnáme hodnoty získané při ohřívání a ochlazování, tak zjistíme, že scany při ochlazování dávají nižší hodnoty termodynamických parametrů i teplot tání.

Tabulka 6.4: Tabulka vypočítaných hodnot termodynamických parametrů a teplot tání (zvláště pro ohřívání a ochlazování) i s odchylkami pro dva vzorky 9-meru DNA se stejnou koncentrací.

	Vzorek ředěný v TB-HW		Vzorek ředěný v PBNa	
<i>Fit2 – ohřívání</i>				
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-64,6	0,5	-64,2	0,7
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-180,6	1,6	-174,5	2,1
T_m [°C]	34,52	0,10	41,84	0,22
<i>Fit2 – ochlazování</i>				
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-61,6	0,2	-63,3	0,7
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-172,0	0,7	-172,4	2,2
T_m [°C]	32,90	0,16	40,85	0,21
<i>Fit5 – ohřívání</i>				
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-62,6	0,5	-63,6	0,7
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-203,6	1,6	-202,4	2,2
T_m [°C]	34,69	0,11	41,83	0,19
<i>Fit5 – ochlazování</i>				
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-58,9	0,3	-62,6	0,8
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-192,4	0,8	-199,8	2,4
T_m [°C]	33,20	0,17	40,83	0,21
<i>Fit7 – ohřívání</i>				
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-23,5	2,9	-53,3	3,2
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-77,4	9,1	-169,0	10,0
T_m [°C]	34,13	0,50	42,35	0,24
<i>Fit7 – ochlazování</i>				
ΔH [kcal.mol ⁻¹]	-12,4	2,3	-44,7	1,2
ΔS [cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	-42,5	7,2	-142,3	3,8
T_m [°C]	29,99	0,74	41,20	0,07

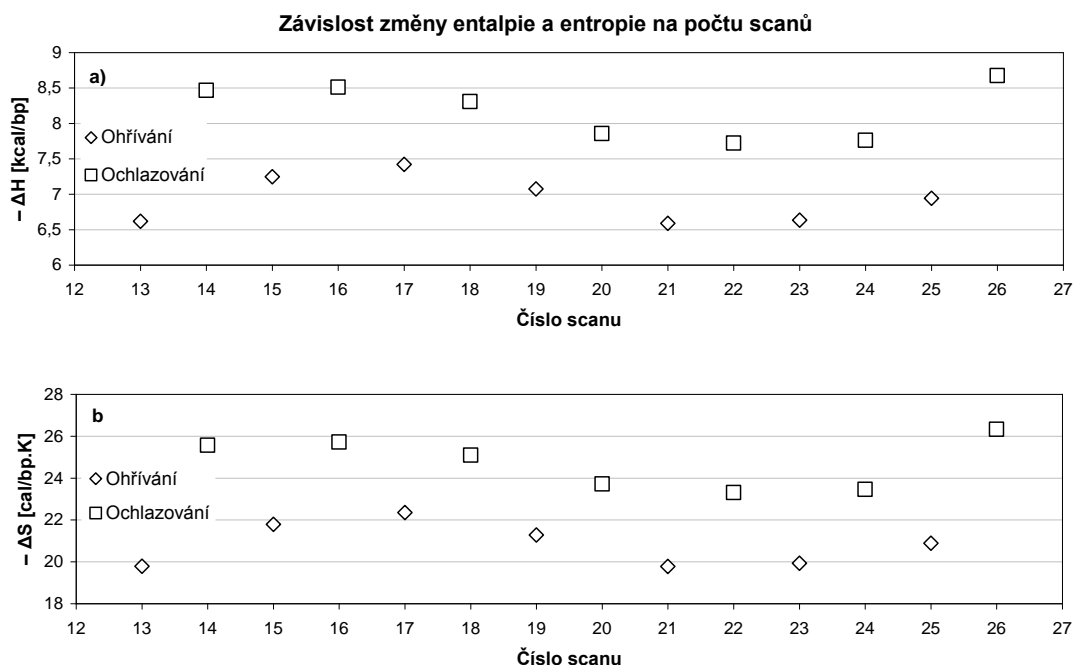
6.6 Vzorek poly(A)+poly(U)

Nakonec jsme ještě proměřili homopolymerní vzorek RNA. U tohoto vzorku nebyla přesně známa délka komplementárních řetězců, proto jsou všechny uvedené výsledky vztaženy na bázevý pár. Měření bylo provedeno při koncentraci 0,2 mM na bázevý pár. Tento vzorek bylo možné zpracovávat pouze bez použití modelu, tedy pomocí Fitu7.

Na obrázku 6.15 je vynesena závislost změny entalpie a změny entropie pro jednotlivé scany pro ohřívání i pro ochlazování. Je vidět, že absolutní hodnoty změn termodynamických parametrů nekolísají nahodile se vzrůstajícím číslem scanu, ale spíše pomalu oscilují. Toto chování je opět možné vysvětlit kolísáním baseliny, tentokrát však ne monotónním.

Abychom zjistili, do jaké míry se komplementární vlákna spletou po smíchání jejich roztoků se stejnou koncentrací v poměru 1:1, jsme roztoky smíchali za pokojové teploty a před vložením do kalorimetru je nezahřívali. Výsledné hodnoty termodynamických parametrů jsou pro první scan trochu nižší než průměrné hodnoty, které jsme vypočítali z ostatních scanů, ale jsou v toleranci chyb pro ostatní scany. Pouze teplota tání vypočítaná z prvního scanu je vyšší než průměrná hodnota. To lze vysvětlit tím, že při ohřívání vzorku docházelo k částečné kompenzaci efektu tání šroubovice nárůstem počtu řetězců, které se tvorby duplexů mohou zúčastnit. Výsledné hodnoty jsou v tabulce 6.5.

U tohoto vzorku se poměrně výrazně liší hodnoty získané pro ohřívání a ochlazování. To bude nejspíš způsobeno tím, že jsme pro zpracování dat mohli použít pouze přístup Fit7, který nedával příliš dobré výsledky ani pro ostatní vzorky. Druhou možností je hysterezní charakter tvorby duplexů u poměrně dlouhých oligonukleotidových vláken, z našich výsledků ho však nemůžeme jednoznačně prokázat.



Obrázek 6.15: Závislost změny entalpie (a) a entropie (b) získané metodou Fit7 pro jednotlivé scany pro ohřívání a ochlazování. Pro vzorek polyA/polyU s koncentrací 0,2 mM(bp) v rozpouštědle PBNa.

Tabulka 6.5: Tabulka vypočítaných hodnot termodynamických parametrů a teploty tání (zvlášť pro ohřívání a ochlazování) i se statistickou chybou počítanou jako standardní deviace pro všechny scany pro vzorek polyA/polyU s koncentrací 0,2 mM(bp).

	1. scan se vzorkem (scan13)	Průměr z ostatních scanů	
<i>ohřívání</i>			
ΔH [kcal.bp ⁻¹]	-6,6	-6,7	0,3
ΔS [cal.bp ⁻¹ .K ⁻¹]	-19,8	-21,0	1,0
T_m [°C]	59,90	59,39	0,20
<i>ochlazování</i>			
ΔH [kcal.bp ⁻¹]		-8,2	0,4
ΔS [cal.bp ⁻¹ .K ⁻¹]		-24,7	1,2
T_m [°C]		58,22	0,35

Závěr

Hlavním cílem práce bylo provedení pilotních měření rozpadu a tvorby duplexů nukleových kyselin pomocí nového mikrok calorimetru, prověření funkce přístroje, rozbor možností zpracování dat a stanovení přesnosti zařízení především s ohledem na možnosti používání nižších koncentrací. Experimenty byly provedeny na třech vzorcích, z nichž dva byly vzorky kratších DNA oligonukleotidů se stejnou sekvencí ve dvou různých rozpouštědlech. Třetí vzorek tvořily RNA homopolynukleotidy.

Experimenty odhalily několik možností, které by do budoucna mohly zlepšit přesnost měření. Ukázalo se, že bude nutné určovat koncentraci vzorků mnohem přesněji, tedy za použití UV absorpce, nejlépe až po odvzdušnění. Dále bude třeba věnovat pozornost průběhu baseliny a hledat možnosti omezení chyb vyvolaných její fluktuací.

Pro zpracování dat jsme vyzkoušeli několik možností, jako nejlepší se ukázal přístup Fit2, kdy se fituje průběh vyrovnávacího příkonu na dvoustavový model rozpadu duplexu. Při fitování dat jsme zjistili, že naše nejnižší koncentrace (0,4 mM v bázeových párech) ještě není koncentračním limitem, protože jak se ukázalo, součet čtverců odchylek mezi experimentálním průběhem a fitem není tvořen šumem, ale odpovídá úbytku signálu se snižovanou koncentrací.

Literatura

- Breslauer K. J. (1995): Extracting Thermodynamic Data from Equilibrium Melting Curves for Oligonucleotide Order-Disorder Transitions. *Methods Enzymol.* **259**, 221–242.
- Palacký J. (2005): Spektroskopické studium vlastností nových modifikovaných oligonukleotidů – potenciálních chemoterapeutik. Diplomová práce, MFF UK, Praha.
- Privalov G., Kavina V., Freire E., Privalov P. L. (1995): Precise scanning calorimetry for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute solution. *Anal. Biochem.* **232**, 79-85.
- Saenger W. (1984): Principles of Nucleic Acid Structure. Springer-Verlag, New York.
- Vaisocherová H. (2002): Určování termodynamických charakteristik komplexů nukleových kyselin na základě analýzy teplotní závislosti UV absorpčních spekter. Diplomová práce, MFF UK, Praha.
- Voet D, Voetová J. G. (1995): Biochemie (český překlad). Victoria Publishing, Praha.