|  |  |
| --- | --- |
| **jméno:** | |
| **obor:** | **datum provedení:** |
| **neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu**  a b c d e f g h (zakroužkujte) | |

přílohy protokolu: graf: kalibrační přímka pro fotometrické stanovení DNA v UV oblasti

**OKRUHY K PŘÍPRAVĚ**

Primární struktura nukleových kyselin. Sekundární struktura nukleových kyselin. Denaturace nukleových kyselin. Absorbující složky nukleových kyselin, absorpční spektrum nukleových kyselin. Lambertův-Beerův zákon. Chemické výpočty.

**Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).**

**Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen části A, B.**

**Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): jen části A, B, C.**

PRINCIP ÚLOHY

**A. Izolace deoxyribonukleové kyseliny**

Nukleové kyseliny se v buňkách často vyskytují ve formě komplexů s proteiny (např. nukleozomy). Podstatou izolace jaderné deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je dezintegrace komplexu DNA-protein a izolace čisté nerozštěpené DNA bez příměsí ribonukleové kyseliny a proteinů.

Prvním krokem při izolace nukleových kyselin je důkladná lýze buněk a tkání s následnou šetrnou homogenizací. Poté se provádí dezintegrace komplexů DNA-protein pomocí detergentu (nejčastěji se jedná o dodecylsíran sodný – SDS) v přítomnosti enzymů, které napomáhají degradaci proteinů. Následuje oddělení denaturovaných proteinů od nukleových kyselin pomocí extrakce organickým činidlem. Mezi často používaná činidla patří fenol, který současně inhibuje nukleasy, nebo směs fenol-chloroform (1:1), popřípadě směs chloroformu a isoamylalkoholu. Posledním krokem je srážení molekul DNA z vodné fáze pomocí organického rozpouštědla (např. isopropanol, ethanol).

V této části úlohy bude provedena extrakce nukleoproteinového komplexu z bakteriálních buněk v přítomnosti dodecylsíranu sodného, deproteinace produktu chloroformem a vysrážení nukleové kyseliny z vodného roztoku ethanolem.

**B. Identifikace DNA obsažené ve vzorku specifickou barevnou reakcí**

V kyselém prostředí hydrolyzují nukleové kyseliny na směs nukleotidů a nukleosidů (hydrolýza fosfodiesterových vazeb), z nichž zejména purinové nukleotidy a nukleosidy dále snadno odštěpují cukernou složku (hydrolýza N-glykosidické vazby spojující cukernou složku s bází). RNA obsahuje jako cukernou složku ribosu, DNA 2´-deoxyribosu. Ribosu a 2´-deoxyribosu lze navzájem odlišit na základě rozdílného zbarvení, které tyto sacharidy poskytují při reakci s difenylaminem po mineralizaci koncentrovanou kyselinou.

**C. Stanovení čistoty DNA spektrofotometrií v UV oblasti, denaturace DNA**

Aromatické heterocykly bází nukleových kyselin absorbují UV záření s maximem **v okolí vlnové délky 260 nm**. Jestliže se nukleové kyseliny nacházejí ve směsi s poteiny, je tvar charakteristického absorpčního spektra nukleových kyselin (s maximem při vlnové délce 260 nm) přítomností proteinů zkreslen, neboť i proteiny absorbují UV záření v této oblasti vlnových délek. Přítomnost nukleových kyselin se však i ve spektru vzorku obsahujícího větší množství proteinů projevuje nezřetelným absorpčním maximem nebo alespoň prodlevou v okolí vlnové délky 260 nm.

**Čistotu nukleové kyseliny** ve vzorku vyjadřují dva základní poměry absorbancí, a to poměr A260/A280 a A260/A230. Poměr A260/A280 udává míru kontaminace izolované nukleové kyseliny proteiny. Pro čistou DNA by měl být poměr 1,7-1,9 a pro čistou RNA 1,8-2,0. Poměr A260/A230 udává míru znečištění nukleové kyseliny nízkomolekulárními látkami (fenol, EDTA, huminové kyseliny, atd.)   
a rovněž proteiny (absorbance peptidové vazby). Pro čistou nukleovou kyselinu by měl být poměr vyšší než 1,5.

Postup izolace DNA by měl být natolik šetrný, aby nedocházelo k její **denaturaci** (rozpadu nativní dvou řetězové struktury). Sekundární struktura nukleové kyseliny silně ovlivňuje absorpci UV záření - u dvou řetězových nukleových kyselin (tzn. především DNA) jsou heterocyklická jádra bází pravidelně uspořádána uvnitř dvoušroubovice a takto uspořádaná struktura absorbuje méně než neuspořádaná jedno řetězová struktura (kromě většiny RNA se jako jedno řetězová vyskytuje denaturovaná DNA). Při rozpadu dvoušroubovice a vzniku nahodilého uspořádání dochází ke vzrůstu absorbance při vlnové délce 260 nm. Pomocí denaturace (nejčastěji tepelné denaturace – zahřátím vzorku DNA na vyšší teplotu a jeho následným rychlým ochlazením) lze zjistit, zda má izolovaný vzorek vlastnosti nativní DNA.

**D. Stanovení koncentrace DNA měřením absorbance v UV oblasti**

Schopnosti nukleových kyselin absorbovat UV záření s absorpčním maximem **při vlnové délce kolem 260 nm** lze využít k jejich **kvantitativnímu stanovení**. V praxi se využívá empiricky zjištěného vztahu, kdy u nativní (dvou řetězové) DNA A260 = 1,0 odpovídá koncentraci 50 μg/ml a u denaturo-vané (jednořetězové) DNA a RNA A260 = 1,0 odpovídá koncentraci 40 μg/ml.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Izolace DNA

**Materiál a vybavení:**

bakteriální buňky (1g vlhkého peletu)

roztok EDTA-NaCl (0,15 mol.l-1 EDTA + 0,1 mol.l-1 NaCl, pH 8,0)

roztok lysozymu (10 mg.ml-1)

25% roztok sodiumdodecylsulfátu (SDS)

5 mol.l-1 chloristan sodný

směs chloroform - isoamylalkohol (24:1)

95% ethanol

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

*pipety, dávkovače, termostat, odměrné válce, centrifuga, centrifugační kyvety, vortex, zkumavka, ledová lázeň*

**Postup:**

K peletu bakteriálních buněk v centrifugační zkumavce přidejte 1 ml roztoku EDTA-NaCl, rozmíchejte na vortexu. K suspenzi připipetujte 2 ml roztoku EDTA-NaCl, 130 ul roztoku lysozymu a směs inkubujte 15 min. při 37 oC (každých 5 minut promíchejte). Ke směsi přidejte 260 ul 25% roztoku SDS, opatrně promíchejte a inkubujte při 60 oC po dobu 10 minut (každé 2 minuty směs promíchejte). Míchejte opatrně, abyste zabránili nadměrnému pěnění. Uvolnění nukleové kyseliny z buněk se projeví zvýšením viskozity roztoku a zákalem.

Poté směs zchlaďte na okolní teplotu pod tekoucí studenou vodou, přidejte 1,2 ml 5 mol.l-1 chloristanu sodného, promíchejte a v digestoři ke směsi přidejte 5,4 ml směsi chloroform - isoamylalkohol (24:1). Obsah zkumavky důkladně promíchejte a centrifugujte 20 minut při 9000 ot/min.

Po centrifugaci se vytvoří tři vrstvy (spodní organická, střední s denaturovanými proteiny a horní vodná obsahující nukleové kyseliny). V digestoři opatrně odeberte (Pasteurovou pipetou nebo dávkovačem) horní vodnou vrstvu do nové 15 ml centrifugační zkumavky a nukleovou kyselinu vysrážejte přidáním dvojnásobného objemu 95% ethanolu. Směs opatrně promíchejte převracením zkumavky, během kterého uvidíte srážející se vlákna nukleové kyseliny. Poté směs centrifugujte   
10 minut při 9000 ot/min. Odlijte supernatant, zkumavku obraťte na tampón buničiny a nechte vytéci veškerý roztok. Pelet rozpusťte v 0,5 ml fyziologického roztoku. Odeberte 50 ul rozpuštěného peletu a přidejte k němu 2 ml fyziologického roztoku. Tento vzorek uschovejte v ledové lázni pro použití v části C úlohy. Zbytek rozpuštěného peletu (cca 0,5 ml) použijte v části B úlohy.

|  |
| --- |
| **Centrifugační zkumavky je nutno přesně vyvážit! Vyvažování kyvet a spuštění centrifugy provádějte pouze pod dohledem personálu laboratoře.** |

PRAKTICKÁ ČÁST B. Identifikace DNA specifickou barevnou reakcí

**Materiál a vybavení:**

standardní roztok deoxyribosy (0,02 mg.ml-1)

standardní roztok ribosy (0,02 mg. ml-1)

standardní roztok DNA (1 mg. ml-1 fyziologického roztoku)

standardní roztok RNA (1 mg. ml-1 fyziologického roztoku)

roztok nukleové kyseliny (získaný v části A úlohy)

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

difenylaminové činidlo (roztok difenylaminu v kyselině octové a kyselině sírové)

*zkumavky, pipety,dávkovače, odměrný váleček, Pasteurova pipeta, kahan a trojnožka nebo vařič, hrnec, kruhový stojan na zkumavky*

**Postup:**

Do zkumavek dávkujte podle rozpisu:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| zkumavka č. | 0,5 ml | *zbarvení* |
| 1 | fyziologický roztok |  |
| 2 | deoxyribosa |  |
| 3 | ribosa |  |
| 4 | DNA |  |
| 5 | RNA |  |
| 6 | roztok nukleové kyseliny z části A \* |  |

\*cca 0,5 ml, rozpuštěný pelet získaný v části A úlohy

Ke vzorkům přidejte cca 1,5 ml difenylaminového činidla a zahřívejte je 10 minut na vroucí vodní lázni. Pozorujte zbarvení vzorků.

|  |
| --- |
| **Difenylaminové činidlo nepipetujte – odměřujte válečkem nebo dávkujte pomocí Pasteurovy pipety!** |

**Vyhodnocení:**

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou v posledním sloupci.

Porovnejte zbarvení roztoku nukleoproteinu se zbarvením kontrolního vzorku (fyziologický roztok) a standardních roztoků ribosy, deoxyribosy, RNA a DNA. Uveďte, zda se zdařilo identifikovat přítomnost DNA v izolovaném produktu:

PRAKTICKÁ ČÁST C. Stanovení čistoty DNA spektrofotometrií v UV oblasti, denaturace DNA

**Materiál a vybavení:**

roztok nukleové kyseliny (získaný v části A úlohy – **zředěný vzorek**)

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

*zkumavky, pipety, fotometr, UV- propustné kyvety , kahan a trojnožka nebo vařič, hrnec, kruhový stojan na zkumavky, ledová lázeň, filtrační papír, nálevka*

**Postup:**

U zředěného roztoku peletu získaného v části A úlohy proměřte absorpční spektrum v oblasti vlnových délek 230 – 300 nm proti fyziologickému roztoku a srovnejte je se spektrem izolovaného nukleoproteinu uloženým v počítači. Měření provádějte v UV propustných plastových kyvetách. Jestliže dosahují absorbance vzorku v kterékoliv části spektra hodnot vyšších než cca 0,6, je nutno vzorek dále zředit fyziologickým roztokem (postačuje ředění odhadem). Ve spektru vzorku obsahujícího dostatečné množství DNA se objevuje absorpční maximum v okolí vlnové délky 260 nm; pokud je absorpční maximum v okolí vlnové délky 280 nm, obsahuje preparát převážně proteiny. Měření spektra provádějte pod dohledem vedoucího cvičení a **teprve po proměření spektra pokračujte další částí úlohy.**

Vzorek nevyhazujte, do dvou zkumavek pipetujte po 1 ml vzorku a zkumavku dobře uzavřete. Jednu zkumavku zahřívejte 15 minut na vroucí vodní lázni a poté její obsah rychle ochlaďte v ledové lázni.. Změřte absorbanci nativního (nezahřívaného) vzorku při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm. a absorbanci denaturovaného (zahřívaného a ochlazeného) vzorku při 260 nm. Měření provádějte v zúžených UV propustných plastových kyvetách a dbejte, aby paprsek fotometru procházel roztokem.

**Vyhodnocení:**

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou o zjištěné experimentální údaje (A230, A260, A280), vypočtěte poměry A260/A230 a A260/A280 a určete přibližné složení (obsah nukleových kyselin, obsah proteinů) v izolovaném preparátu. (Předpoklad: preparát neobsahuje další složky absorbující UV záření při vlnových délkách 260 a 280 nm.)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| A230 | A260 | A280 | A260/A230 | A260/A280 |
|  |  |  |  |  |

Popište čistotu získaného preparátu (obsah DNA, proteinů, nízkomolekulárních látek):

Uveďte absorbance při vlnové délce 260 nm:

|  |  |
| --- | --- |
| A260 – nativní vzorek | A260 – denaturovaný vzorek |
|  |  |

Získaný výsledek vysvětlete:

PRAKTICKÁ ČÁST D. Stanovení koncentrace DNA měřením absorbance v UV oblasti

**Materiál a vybavení:**

standardní roztok DNA (1 mg.ml-1 fyziologického roztoku)

**neznámý vzorek DNA pro kvantitativní analýzu**

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

*zkumavky, pipety, dávkovače, odměrná baňka 10 ml, vortex, fotometr, UV-propustné kyvety*

**Postup:**

Standardní roztok DNA (1 mg.ml-1) zřeďte tak, že 0,25 ml standardního roztoku DNA doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promícháte. Stejným způsobem zřeďte neznámý vzorek DNA. Podle tabulky připravte jednak sadu roztoků vzorků o šesti známých koncentracích DNA k sestrojení kalibrační závislosti (zkumavky 1-6) a dále 2 paralelní zkumavky s roztokem DNA o neznámé koncentraci (zkumavky 7-8). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok - nulová koncentrace DNA) použijete později jako slepý vzorek.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| zkumavka  č. | pipetovaný objem | | | c(DNA)  [mg.ml-1] | A260 |
| zředěný standardní roztok DNA [ml] | zředěný neznámý vzorek DNA [ml] | fyziol. roztok  [ml] |
| 1 | 0 | 0,0 | 2,5 | 0,000 | 0,000 |
| 2 | 0,5 | 0,0 | 2,0 |  |  |
| 3 | 1,0 | 0,0 | 1,5 |  |  |
| 4 | 1,5 | 0,0 | 1,0 |  |  |
| 5 | 2,0 | 0,0 | 0,5 |  |  | ØA260 |
| 6 | 2,5 | 0,0 | 0,0 |  |  |
| 7 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | **?** |  |  |
| 8 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | **?** |  |

Změřte absorbanci vzorků při vlnové délce 260 nm proti slepému vzorku (zkumavka č.1). **Měření provádějte v UV plastových kyvetách.**

Prostudujte spektra nativní (dvouřetězové) a denaturované (jednořetězové) DNA uložená v počítači (zapište koncentraci vzorků a jejich absorbanci při vlnové délce 260 nm).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | koncentrace  [mg.ml-1] | A260 |   (uveďte fyzikální rozměr!) |
| ds-DNA |  |  |  |
| ss-DNA |  |  |  |

**Vyhodnocení:**

Vypočítejte koncentrace DNA ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky.

Vypočítejte průměr absorbancí ve zkumavkách č. 7-8 a doplňte do tabulky. Sestrojte kalibrační graf (závislost A260na koncentraci DNA ve zkumavce). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte **koncentraci DNA ve zředěném neznámém vzorku** (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek. Ředění neznámého vzorku:krát

Tímto faktorem vynásobte fotometricky zjištěnou koncentraci DNA a získáte koncentraci DNA v původním neznámého vzorku.

**Výsledek:**

**koncentrace DNA v neznámém vzorku: c = mg.ml-1**

Ze směrnice přímky odečtěte miligramový absorpční koeficient DNA při vlnové délce 260 nm: ε260 (doplňte fyzikální rozměr) :

Určete, zda standardní roztok DNA obsahoval nativní nebo denaturovanou DNA:

**KONTROLNÍ LIST**

|  |  |
| --- | --- |
| **jména:** | |
| **obor:** | **datum provedení:** |
| **neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu**  a b c d e f g h (zakroužkujte) | |

**ÚLOHA 5C**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| A230 | A260 | A280 |
|  |  |  |

|  |  |
| --- | --- |
| A260 – nativní vzorek | A260 – denaturovaný vzorek |
|  |  |

Podpis vedoucího cvičení:

**ÚLOHA 5D**

|  |  |
| --- | --- |
| zkumavka  č. | A260 |
| 1 | 0,000 |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |
| 5 |  |
| 6 |  |
| 7 |  |
| 8 |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | koncentrace  [mg.ml-1] | A260 |
| ds-DNA |  |  |
| ss-DNA |  |  |

Podpis vedoucího cvičení: