

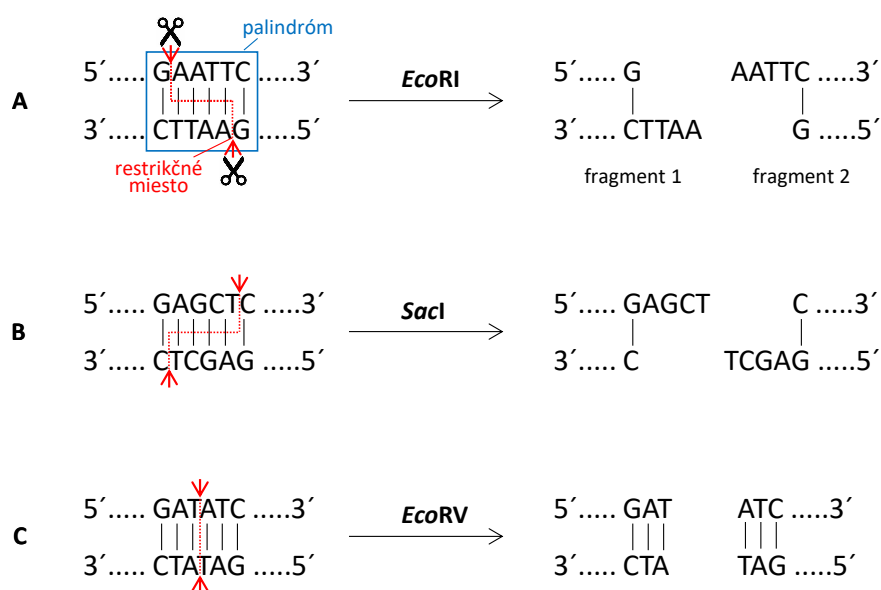
Teoreticko – praktická časť

Praktická úloha č. 1

MOLEKULOVÁ BIOLÓGIA – Restričná analýza DNA

Teória

V bunkách mnohých baktérií a iných mikroorganizmov boli objavené a izolované špeciálne enzýmy, nazývané *restričné endonukleázy* (ďalej *restriktázy*), ktoré sú schopné štiepiť (prestrihnúť) molekulu DNA. Restriktázy skenujú nukleotidy pozdĺž molekuly DNA a vyhľadávajú špecifickú sekvenciu, ktorú rozpoznávajú. Ako je zobrazené na Obr. 1, toto rozpoznávacie, tzv. *restričné miesto*, má zvyčajne štruktúru *palindrómu* (rovnakú sekvenciu nukleotidov v smere 5'→3' na oboch vláknach DNA a dĺžku 4 – 8 párov nukleotidov. Akonáhle je restriktáza lokalizovaná, viaže sa na molekulu DNA a špecificky štiepi väzbu medzi nukleotidmi obidvoch vlákien DNA. Štiepenie bude pokračovať na každom nájdenom restričnom mieste, po celej dĺžke molekuly DNA, ktorá sa následne rozpadne na fragmenty. Vzniknuté fragmenty môžu mať rôzne typy zakončení. Jedným typom sú jednovláknové (prečnievajúce) konce, ktoré nazývame kohézne alebo lepkavé konce. Takéto konce vznikajú napríklad po štiepení DNA restriktázou *EcoRI*, rozpoznávajúcou sekvenciu 5'-GAATTC-3' a zanechávajúcou 5'-prečnievajúce konce (Obr. 1A). Naopak, restriktáza *SacI* zanecháva 3'-prečnievajúce konce po rozpoznaní a štiepení sekvencie 5'-GAGCTC-3' (Obr. 1B). Iným typom zakončení fragmentov DNA sú tzv. tupé konce bez jednovláknového prečnievania. Vznikajú napríklad štiepením restriktázou *EcoRV*, ktorá rozpoznáva sekvenciu 5'-GATATC-3' a štiepi obe vlákna DNA v rovnakom mieste (Obr. 1C).



Obr. 1. Príklady rozpoznávacích miest pre niektoré restričné endonukleázy a výsledky štiepenia DNA týmito enzýmami.

Metóda, ktorá slúži na separáciu (oddelenie) fragmentov DNA vzniknutých restriktčným štiepením a na určenie ich dĺžky, je agarózová gélová elektroforéza. K separácii fragmentov dochádza priamo v agarózovom géli (umiestnenom v elektroforetickom tlmivom roztoku) pomocou aparatury, ktorá vytvorí elektrické pole. Vďaka svojmu náboju sa fragmenty DNA v elektrickom poli pohybujú a súčasne sa od seba separujú, a to na základe ich veľkosti (dĺžky v básových pároch; „bp“). Všeobecne platí, že čím sú molekuly kratšie, tým viac sú pohyblivé, a naopak, čím sú molekuly dlhšie, tým sa pohybujú pomalšie. Kratšie fragmenty tak za rovnaký čas separácie prejdú väčšiu vzdialenosť ako dlhšie od miesta, kde bola vzorka pridaná do gélu (jamka gélu). Rýchlosť pohybu fragmentov DNA v géli je tiež daná hustotou agarózy, z ktorej sa gél pripravuje. Čím viac agarózy gél obsahuje, tým je vhodnejší na separáciu menších fragmentov DNA, nakoľko pozostáva z pórov s menším priemerom, cez ktoré molekuly DNA prechádzajú pomalšie. Napr. 2 % agarózový gél je vhodný na separáciu fragmentov DNA s veľkosťou 100 – 2 000 bp; v 0,7 % agarózovom géli efektívne separujeme fragmenty DNA s veľkosťou 800 – 12 000 bp.

Praktická úloha

Cieľ:

Restriktázy sú klasickým, často využívaným nástrojom molekulovej biológie a genetiky. Kvôli ich špecifickosti pri štiepení DNA môžu byť použité na „mapovanie“ sekvencií DNA analýzou fragmentov vytvorených po restriktčnom štiepení. Cieľom experimentu je na základe restriktčnej analýzy vzorky DNA – kružnicovej molekuly plazmidu pUK1 (Obr. 2A) – a následnej analýzy agarózovou gélovou elektroforézou určiť, ktorému z restriktčných enzýmov prislúcha získaný profil analyzovanej DNA.

Materiál:

Na pracovnom stole – mikropipeta, špičky, stojan, prázdna mikroskúmavka, mikroskúmavka so vzorkou DNA (označená DNA), mikroskúmavka s tlmivým roztokom pre restriktázu (označená TR), mikroskúmavka so sterilnou vodou (označená H₂O), mikroskúmavka s roztokom Novel Juice (označená NJ), fixka, rukavice, vortex

U vedúceho úlohy – restriktáza, ukazovateľ molekulových veľkostí DNA

Spoločné – centrifúga, termoblok, elektroforetická aparátúra, 0,8 % agarózový gél, elektroforetický roztok, transiluminátor s kamerou

Restriktčná analýza - postup:

1. Prázdnu mikroskúmavku označte svojím kódom.
2. V takto označenej mikroskúmavke pripravte reakčnú zmes (v celkovom objeme 20 µl), a to napipetovaním jednotlivých zložiek v nasledovnom poradí:

H ₂ O	13 µl
TR (tlmivý roztok)	2 µl
DNA	4 µl
restriktáza (pridá vedúci úlohy)	1 µl

3. Reakčnú zmes jemne premiešajte na vortexe, krátko scentrifugujte, vložte do termobloku a inkubujte 10 minút pri teplote 37 °C.

Analýza dĺžky fragmentov DNA agarózovou gélovou elektroforézou - postup:

1. K poštiepenej DNA pridajte 4 µl farbiaceho roztoku Novel Juice. Ten zabezpečí, aby vzorky pri nanášaní klesli do jamiek gélu (nevyplávali na hladinu) a zároveň umožní približne sledovať pohyb DNA v géli.
2. Z takto pripravenej vzorky DNA odpipetujte 12 µl a opatrne naneste priamo do príslušnej jamky v agarózovom géli.
3. Do jednej z jamiek gélu naniesie vedúci úlohy ukazovateľ molekulových veľkostí DNA. Ten je tvorený lineárnymi fragmentami DNA, preto je vhodný na orientačné určovanie dĺžky lineárnych fragmentov získaných po štiepení analyzovanej DNA. Jednotlivé fragmenty ukazovateľa molekulových veľkostí DNA majú presne definované dĺžky, a tak sa počas elektroforetického delenia rozmiestnia v géli od najdlhšieho po najkratší (Obr. 2B).

Vedúci úlohy aparátúru uzavrie a zapne zdroj elektrického prúdu.

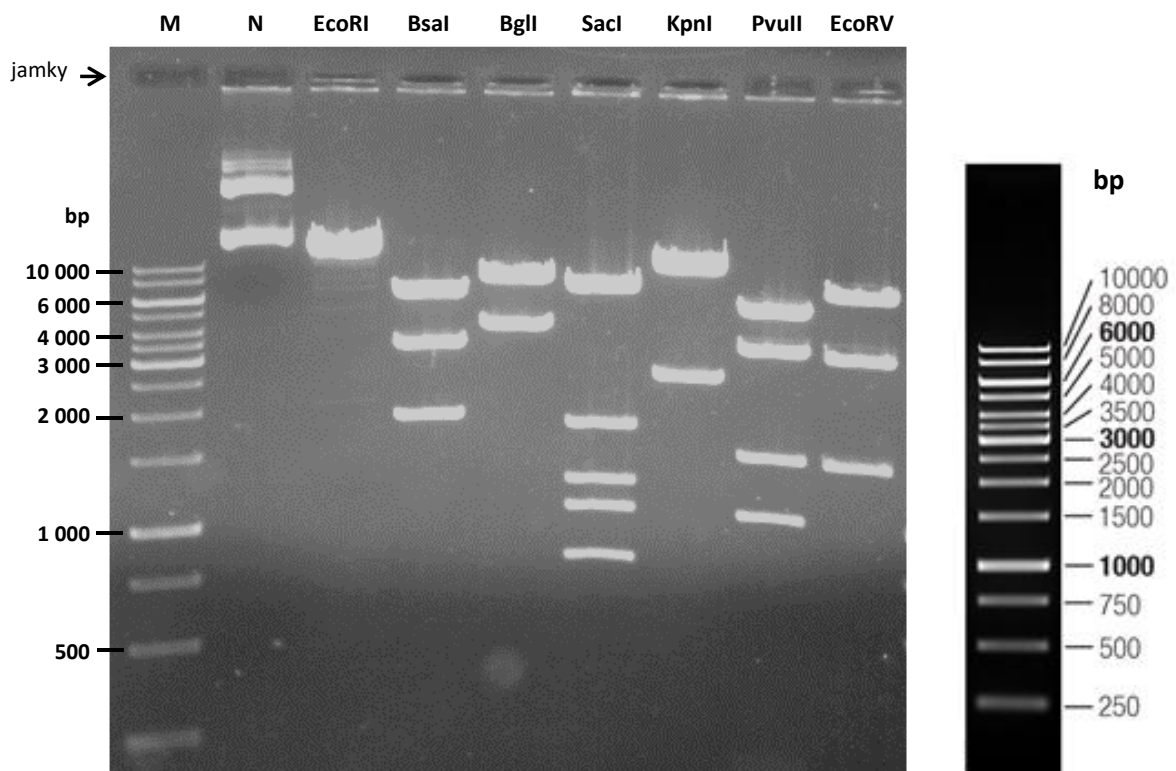
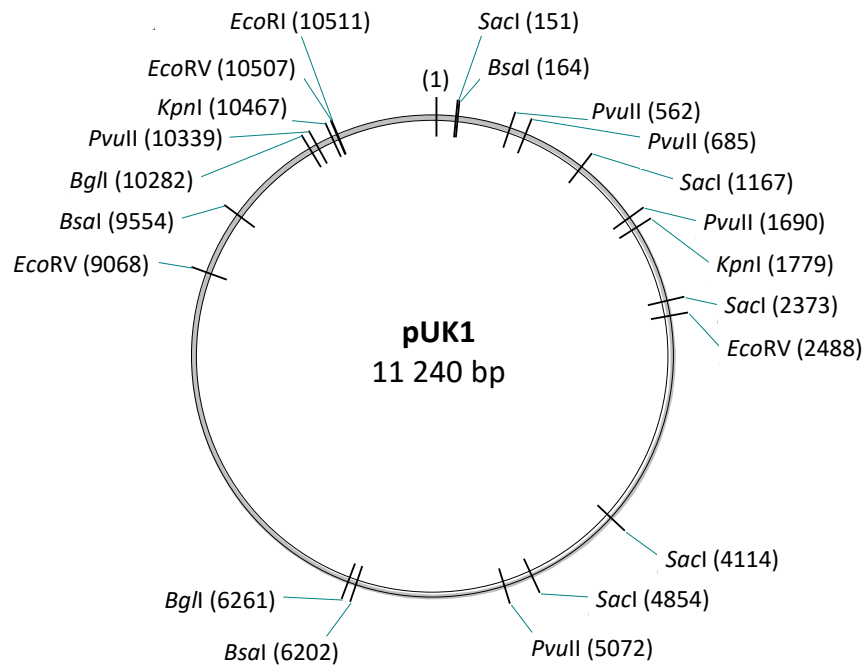
4. Vzorok separujte 40 minút pri 135 V.
Fragmenty analyzovanej DNA sa v elektrickom poli navzájom oddelia, pričom sa v agarózovom géli pohybujú rýchlosťou, ktorá je určená jednak ich dĺžkou – najkratšie fragmenty sa pohybujú najrýchlejšie, ale aj tvarom molekuly DNA – lineárne molekuly sa pohybujú výrazne rozdielne ako kružnicové.
5. Po tomto čase vedúci úlohy vizualizuje získaný restričný profil na transiluminátore a výsledok restričnej analýzy odfotí.
6. Získaný restričný profil testovanej DNA pozorne porovnajte s restričnými profilmi na Obr. 2B a dĺžky získaných fragmentov orientačne určte pomocou ukazovateľa molekulových veľkostí DNA.
K získanému restričnému profilu priradte restričnú endonukleázu a následne, pomocou mapy plazmidu pUK1 (Obr. 2A), presne vypočítajte dĺžky získaných fragmentov analyzovanej DNA (v bázoých pároch; „bp“).

Výsledok analýzy:

Testovaná vzorka DNA bola štiepená restričnou endonukleázou

Dĺžky jednotlivých fragmentov testovanej vzorky DNA sú

.....

A

Obr. 2. Mapa plazmidu pUK1 použitého na restrikčnú analýzu a jeho restrikčné profily získané štiepením vybranými restrikázami.

A. Mapa kružnicovej molekuly pUK1 (dĺžka 11 240 bázových párov „bp“) s vyznačenými polohami restrikčných miest pre vybrané restrikτάzy. V zátvorke je uvedené poradie prvého nukleotidu restrikčného miesta vzhľadom k celkovej dĺžke plazmidu.

B. Restrikčné profily plazmidu pUK1 po separácii agarovou gélovou elektroforézou. Označenia dráh (ak nie je uvedené inak) nesú názov restrikčnej endonukleázy, ktorej štiepením plazmidu pUK1 bol získaný príslušný restrikčný profil.

M – ukazovateľ molekulových veľkostí DNA (úplný popis je schematicky znázornený vpravo od gélu)

N – neštiepený plazmid pUK1

Teoretické úlohy a otázky

1. V ktorej dráhe gélu na Obr. 2B sa nachádza fragment DNA, ktorý definuje presnú dĺžku plazmidu pUK1? Aká je dĺžka tohto fragmentu?

.....

2. V ktorej dráhe gélu na Obr. 2B vidíme molekuly DNA, ktorých dĺžka nemôže byť určená pomocou ukazovateľa molekulových veľkostí DNA? Stručne vysvetlite prečo.

.....

.....

.....

.....

.....

3. Jeden z restričných profilov na Obr. 2B nie je kompletný. O ktorý profil ide? Ktorý z fragmentov, ktoré očakávate po štiepení pUK1 príslušnou restriktázou, chýba a prečo? Navrhните, ako by ste zmenili podmienky experimentu tak, aby ste získali všetky fragmenty tohto konkrétneho restričného profilu.

.....

.....

.....

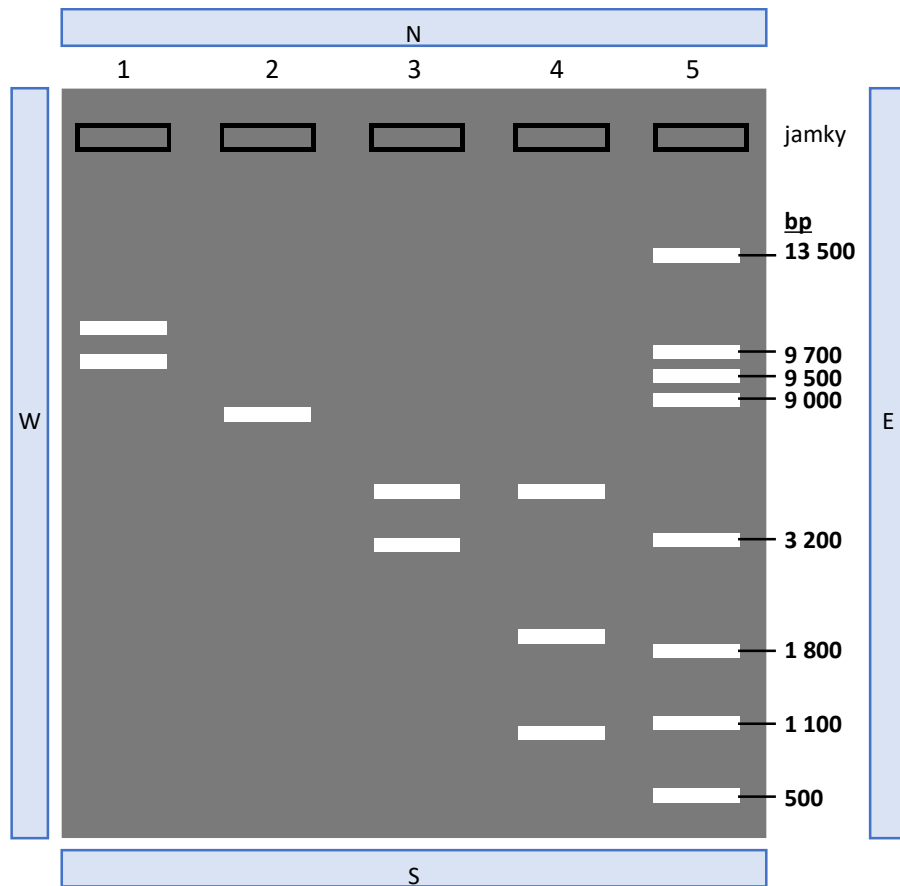
.....

.....

.....

.....

4. Po štiepení plazmidu pKGE restriktčnými endonukleázami *DraI* a *SacI* a po následnej elektroforéze v agarózovom géli ste získali restriktčné profily schematicky znázornené na Obr. 3.



Obr. 3. Restriktčné profily plazmidu pKGE získané štiepením restriktázami.

- 1 – neštiepený plazmid pKGE
- 2 – plazmid pKGE štiepený restriktázou *DraI*
- 3 – plazmid pKGE štiepený restriktázou *SacI*
- 4 – plazmid pKGE štiepený restriktázou *DraI* a *SacI* súčasne
- 5 – ukazovateľ molekulových veľkostí DNA

Pri elektroforetickom delení umiestnenie kladnej elektródy predstavuje elektróda
(uvedte písmeno v príslušnom modrom obdĺžniku). Svoju odpoveď stručne zdôvodnite.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Aká je približná dĺžka plazmidu pKGE?
6. Koľkokrát sa v molekule pKGE nachádza sekvencia 5'-GAGCTC-3'?
7. Ako by vyzerala dráha 3, ak by restriktáza *SacI* nebola katalyticky aktívna? Z Obr. 3 vyberte dráhu, ktorá by zodpovedala takémuto stavu:
8. Ako by vyzerala dráha 4, ak by restriktáza *SacI* nebola katalyticky aktívna? Z Obr. 3 vyberte dráhu, ktorá by zodpovedala takémuto stavu: