

TÉMA	NUKLEOVÉ KYSELINY
Úloha 36:	Elektroforéza nukleových kyselín
Reagencie:	1. $0,5 \times$ TBE (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 2 mM kyselina etyléndiamíntetraoctová) 2. agaróza 3. <i>loading dye</i> (0,1 % roztok <i>xylene cyanol</i> a 0,1 % roztok <i>bromphenol blue</i> v 50 % glycerole) 4. etídium bromid (1 mg/ml) 5. vyizolovaná DNA z úlohy 35 (10 μ l vzorky DNA + 3 μ l <i>loading dye</i>)
Materiál:	elektroforetická aparátúra, mikropipety, kadička s objemom 100 ml, mikrovlnka
Postup:	Zriedením si zo zásobného roztoku $5 \times$ TBE pripravíme tlmivý roztok $0,5 \times$ TBE. Na prípravu 1 % gélu potrebujeme 80 ml $0,5 \times$ TBE, 0,8 g agarózy a 80 μ l etídium bromidu. Všetko spolu zmiešame a prevaríme. Po ochladení na približne 60 °C nalejeme gél do pripravenej aparátúry. Zasunieme hrebeň. Po stuhnutí gélu z neho opatrne vytiahneme hrebeň (slúži na tvorbu komôrok) a gél v aparátúre prelejeme roztokom $0,5 \times$ TBE. Do komôrok potom nanášame vzorky DNA (10 μ l) zmiešané s tzv. <i>loading dye</i> (3 μ l). Nastavíme napätie (~ 150 V) a spustíme elektroforézu. Vzorka DNA sa pohybuje od katódy (záporná elektróda) k anóde (kladná elektróda). Približne po 60 min elektroforézu vypneme.
Pozorovanie:	Pod UV lampou pozorujeme pásy plazmidovej DNA. Ich vzdialenosť od štartu závisí od ich veľkosti a stupňa zbalenia.
Úloha 37:	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty nukleových kyselín
Princíp:	<p>Molekuly nukleových kyselín obsahujú purínové a pyrimidínové zásady, ktoré majú aromatický charakter a absorbujú ultrafialové žiarenie s vlnovou dĺžkou 200 – 300 nm. Pri spektrofotometrickom stanovení koncentrácie nukleových kyselín meriame absorbanciu pri 260 nm. Absorbancia s hodnotou 1 pri 260 nm odpovedá koncentrácii: 50 μg/ml pri dvojvláknovej DNA, 40 μg/ml pri jednovláknovej DNA, 40 μg/ml pri molekule RNA, 20 μg/ml pri oligonukleotidoch.</p> <p>Molekuly nukleových kyselín sú najčastejšie znečistené proteínmi, ktoré majú absorpčné maximum 280 nm. Pomer absorbancií pri 260 nm a 280 nm udáva čistotu nukleových kyselín. Ak je pomer A_{260nm}/A_{280nm} v rozmedzí 1,8 až 2,0, môžeme hovoriť o dostatočne čistej DNA alebo RNA.</p>
Reagencie:	1. vyizolovaná DNA z úlohy 35 2. 45 mM tlmivý roztok Tris
Materiál:	UV-VIS absorpčný spektrofotometer, mikropipety, kremenné kyvety
Postup:	Na UV-VIS spektrofotometri nastavíme rozmedzie vlnových dĺžok od 350 do 220 nm. Do kremennej kyvety napipetujeme 3 ml tlmivého roztoku Tris a odmeriame absorbanciu (tzv. <i>baseline</i>). Potom do tej istej kyvety pridáme také množstvo DNA, aby výsledná absorbancia pri 260 nm bola v rozmedzí 0,5 až 1,2. Nakoniec zaznamenáme hodnotu absorbancie pri 260 a 280 nm.
Vyhodnotenie:	Z hodnôt absorbancií pri 260 nm a 280 nm vypočítame koncentráciu a čistotu DNA.
Záver:	Uvedieme koncentráciu a čistotu našej vzorky DNA.

Úloha 38:	Teplotná stabilita nukleových kyselín
Princíp:	<p>Často používaný spôsob na denaturáciu DNA je využitie vysokej teploty, ktorej účinkom dochádza k vzájomnému oddelovaniu vlákien DNA. Keďže sa makromolekula DNA vyznačuje výraznou absorpciou pri 260 nm, je možné tento proces monitorovať spektrofotometricky. Pri prechode dvojláčkovej DNA na jednovláčkové zložky dochádza k zvyšovaniu absorpcie približne o 30%. Tomuto javu hovoríme hyperchrómny efekt.</p> <p>Jedným z parametrov, ktorý poukazuje na stabilitu DNA je teplota prechodu, T_m (teplota, pri ktorej je polovica pôvodnej dvojláčkovej DNA vo forme príslušných jednovláčkových reťazcov). Hodnota T_m značne závisí od množstva G–C párov. Je známe, že medzi guanínom a cytozínom sú 3 vodíkové väzby, na rozdiel od adenínu a tymínu, medzi ktorými sú len 2 vodíkové väzby. V praxi to znamená, že so zvyšujúcim sa podielom G–C párov narastá aj teplota prechodu makromolekuly DNA.</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. vyizolovaná DNA z úlohy 35 2. 45 mM tlmivý roztok Tris
Materiál:	UV-VIS absorpčný spektrofotometer, mikropipety, kremenné kyvety
Postup:	<p>Ak je k dispozícii spektrofotometer s elektronicky riadeným ohrevom (softvérovo ovládaným Peltierovým článkom), napipetujeme potrebné množstvo vyizolovanej nukleovej kyseliny do kremennej kyvety s tlmivým roztokom a nastavíme ohrev na 2 °C/min. Začiatočnú teplotu nastavíme na 30 °C a koncovú na 90 °C. Spustíme meranie. Zaznamenávame spektrá v rozmedzí vlnových dĺžok 220 až 350 nm.</p>
Vyhodnotenie:	<p>Zostrojíme graf závislosti absorpcie pri 260 nm od teploty. Bodmi preložíme krivku (tzv. S-krivka) a odčítame teplotu prechodu ($T_m = \text{melting temperature}$) našej vzorky plazmidovej DNA.</p>
Záver:	Uvedieme hodnotu T_m našej vzorky DNA.