

**Univerzita Palackého
Přírodovědecká fakulta**



**Základní praktická cvičení
z molekulární biologie**

Kolektiv autorů:

Doc. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

RNDr. Lenka Uvírová

Mgr. Petr Nádvorník, Ph.D.

Ing. Marie Kubaláková

Ing. Jana Klukáčková

Olomouc 2004

Obsah:

I. ZÁKLADY PRÁCE V LABORATOŘI:	3
1. Zásady aseptické práce v laboratoři:	3
2. Měření pH:	3
3. Pufrý:	4
4. Roztoky:	4
5. Měření objemů:	5
6. Centrifugace:	6
II. NÁVODY K PRAKTICKÝM CVIČENÍM:	8
NUKLEOVÉ KYSELINY:	8
Úkol č. 1: Izolace plazmidové DNA z bakterií	10
Úkol č. 2: Transformace kompetentních bakterií	12
Úkol č. 3: Izolace deoxyribonukleoproteinů ze sleziny vysolovací metodou	13
Úkol č. 4: Izolace genomové DNA z listů tabáku	14
Úkol č. 5: Izolace genomové DNA z ptáčích krve fenol-chloroformovou metodou	16
Úkol č. 6: Měření koncentrace DNA	18
Úkol č. 7: Měření čistoty DNA	19
Úkol č. 8: Separace nukleových kyselin pomocí elektroforézy v agarózovém gelu	21
Úkol č. 9: Izolace RNA pomocí činidla Tri Reagent (fy Sigma)	23
Úkol č. 10: Izolace celkové RNA pomocí LiCl	24
Úkol č. 11: Měření koncentrace RNA	25
Úkol č. 12: Měření čistoty RNA	26
PROTEINY:	27
Úkol č. 13: Izolace frakce imunoglobulinů IgG z králíčího krevního séra	28
Úkol č. 14: Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové	30
Úkol č. 15: Stanovení molekulových hmotností proteinů pomocí polyakrylamidové elektroforézy v denaturujících podmínkách	31
III. PŘÍPRAVA POUŽITÝCH ROZTOKŮ:	33
IV. DOPORUČENÁ LITERATURA:	39
V. PŘÍLOHA:	40

I. Základy práce v laboratoři:

1. Zásady aseptické práce v laboratoři:

Laboratoř explantátových kultur:

Kultivace explantátů musí probíhat ve sterilních podmínkách, živná media jsou optimální i pro růst bakterií a plísní. Při zakládání kultury se explantáty sterilizují nejčastěji chemickými prostředky obsahující chlor a kyslík (Chloramin B, Chlórové vápno aj.). Kultivační media se sterilizují v autoklávu. Pokud se některá složka media nesmí autoklávkovat, sterilizuje se filtrací přes nitrocelulozový filtr 0,22 μm a potom se přidá do chladnoucího autoklávkovaného media. Manipulace s explantátovými kulturami se provádí ve sterilním prostředí ve flow boxu, kde se vzduch filtruje přes Hepa filtry. Používané nástroje (např. pinzeta, skalpel) se sterilizují v horkovzdušné sušárně při 140°C 2 hodiny a během práce ve flow boxu v 70% ethanolu a opálením nad kahanem.

Mikrobiologická laboratoř:

Pro práci platí stejné zásady jako v laboratoři explantátových kultur.

Laboratoř molekulární biologie:

Práce se provádí v běžné laboratoři. Pouze pipetování roztoků a práce, kde je riziko kontaminace DNA a roztoků chemikálií, se provádí asepticky v ochranných rukavicích ve flow boxu. Většina chemikálií pro molekulární biologii je finančně nákladná, proto je vhodné připravit si jejich alikvotní množství a uchovávat je v doporučených podmínkách (např. v mrazícím boxu při -20°C až -80°C. Roztoky se sterilizují filtrací nebo autoklávkováním. Kontaminaci chemikálií lze předcházet používáním sterilních (autoklávkovaných) špiček, případně ochranných rukavic.

Při práci s RNA je nezbytné vyhnout se jakékoliv kontaminaci ribonukleázami, které jsou velmi stabilní a ke své funkci obvykle nevyžadují žádné kofaktory. Proto je nutné používat chemikálie a roztoky prosté ribonukleáz a sterilní jednorázové plastové pomůcky, které jsou po izolaci likvidovány.

2. Měření pH:

Základním prostředím pro reakce v molekulární biologii je voda. Iontové sloučeniny v ní rozpuštěné disociují a ovlivňují tak pH roztoku. Tato veličina je definována jako záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$). pH vodných roztoků nabývá hodnot od 1 do 14. Roztoky neutrální mají hodnotu pH 7. S rostoucí hodnotou pH se zvyšuje alkalita roztoku, zároveň klesá jeho acidita a naopak. Hodnoty pH jsou závislé na teplotě. To znamená, že tentýž roztok vytemperovaný na různé teploty bude vykazovat odlišné hodnoty pH.

Pro správný průběh chemických reakcí je nutné pH roztoků měřit. Pro velmi hrubý odhad pH se používají acidobazické indikátory (např. lakmus, fenolftalein, bromfenolová modř). Pro přesnější odhad pH existují indikátorové papírky, které po kontaktu s kapalinou, jejíž pH se zjišťuje, změni své zbarvení. Tato změna se porovná s barevnou stupnicí s označenými hodnotami pH.

Přesné měření pH roztoků se provádí pomocí elektronických pH-metrů se pH elektrodou, která se ponoří do roztoku, a pH se odečítá na stupnici přístroje. Pro měření pomocí pH-metru platí tyto zásady:

- při měření fixovat elektrodu vždy ve vertikální poloze
- během měření roztok mírně promíchávat (míchadlem na magnetické míchačce)
- nikdy nedávat elektrodu do roztoků obsahujících SDS (laurylsíran sodný)
- měřit pH v intervalu mezi hodnotami použitých kalibračních roztoků
- mezi měřeními nenechat vyschnout diafragma elektrody
- po ukončení měření omýt elektrodu destilovanou vodou
- pro úpravu pH používat pouze chemikálie určené k tomuto účelu

3. Pufry:

Chemické reakce musí velmi často probíhat za konstantní hodnoty pH, a proto je provádíme v prostředí vhodných roztoků, tzv. pufrů (tlumivé roztoky). Jsou to roztoky kyseliny (HA) a k ní konjugované zásady (A^-) či zásady (B) a k ní konjugované kyseliny (BH^+). Pufry jsou schopné po přidání kyseliny či zásady udržovat pH roztoku na potřebné hodnotě, dokud není vyčerpána jejich tlumivá kapacita.

4. Roztoky:

Roztoky jsou směsi, které obsahují jednu nebo více rozpuštěných látek v rozpouštědle. Pro popis obsahu látky rozpuštěné v roztoku existuje několik způsobů:

Vyjádření složení roztoku koncentrací:

Koncentrace roztoku rozpuštěné látky v rozpouštědle se vyjadřuje v těchto jednotkách: mol/l nebo mol/dm³. Stále se ale používá označení v M (molarita), které již ale není podle nomenklatury SI správné. Tedy roztok o koncentraci 5 mol/dm³ je totéž jako 5 mol/l roztok nebo jako 5 M roztok.

Ne všude se však používají základní jednotky SI. Významně se při označování konkrétních hodnot jednotlivých veličin používají odvozené jednotky, které navíc obsahují předponu, která znamená dekadický násobek základní jednotky. Obvykle se dekadické zpřesnění předponou pohybuje v rámci tří řádů (např. 1 ml = 10⁻³ l, 1 µl = 10⁻⁶ l, 1 nl = 10⁻⁹ l, 1 pl = 10⁻¹² l).

Roztok má koncentraci 1 mol/l, jestliže je v jednom litru rozpuštěno tolik gramů látky, kolik číselně odpovídá její relativní molekulové hmotnosti (ta je definována jako součet relativních atomových hmotností všech prvků ve sloučenině vynásobených jejich stechiometrickými koeficienty).

Vyjádření složení roztoku poměrem:

Tento způsob vyjadřování množství rozpuštěné látky v roztoku je velmi běžný a vyjadřuje, jaký podíl z celkového objemu roztoku tvoří rozpuštěná látka. Nejužívanější způsoby jsou:

- procento % (1% = 1/100 celku)
- promile ‰ (1‰ = 1/1000 celku)
- ppm (part per million, 1ppm = 10⁻⁶ celku)
- ppb (part per billion, 1ppb = 10⁻⁹ celku)

V souvislosti se složením roztoku je možné se v literatuře setkat s následujícími symboly:

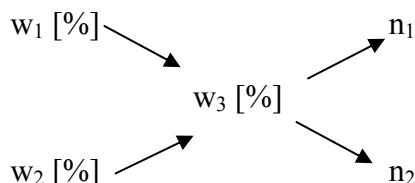
- (w/v) - hmotnostní zlomek (angl. weight - hmotnost, volume - objem)
např. 2% (w/v) vodný roztok NaCl znamená, že 2 g NaCl budou rozpuštěny ve vodě a celkový objem roztoku bude 100 ml

- (v/v) - objemový zlomek - (angl. volume = objem)
např. 1% (v/v) vodný roztok glycerolu znamená, že 1ml glycerolu bude rozpuštěn ve vodě a celkový objem roztoku bude 100 ml

Křížové pravidlo:

Nejjednodušší způsob, kterým lze vypočítat koncentraci roztoku, připravujeme-li jej ředěním roztoku zásobního či smísením dvou roztoků téže látky o různých koncentracích, je křížové pravidlo:

Obecné schéma křížového pravidla:



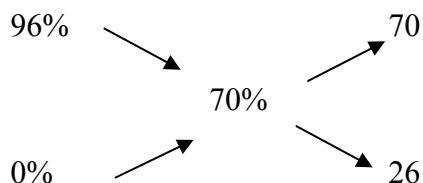
w_1 ... koncentrace prvního roztoku v %
 w_2 ... koncentrace druhého roztoku v %
 w_3 ... koncentrace výsledného roztoku v %
 n_1 ... počet dílů roztoku o koncentraci w_1
 n_2 ... počet dílů roztoku o koncentraci w_2

Platí: $n_1 = |w_3 - w_2|$

$n_2 = |w_3 - w_1|$

Př.: Připravte 100 ml 70% ethanolu z 96% ethanolu a destilované vody.

Řešení: Nejprve dosadíme do křížového pravidla a vypočítáme hodnoty n_1 a n_2 .



Z křížového pravidla vyplývá, že 70% roztok ethanolu získáme smísením 70 dílů 96% ethanolu a 26 dílů destilované vody. Celkový objem roztoku je 100 ml a to odpovídá 96 dílům, tj. 70 dílů + 26 dílů. Z toho vyplývá, že 1 díl odpovídá přibližně 1,04 ml. Pro přípravu 100 ml 70% roztoku ethanolu tedy potřebujeme 72,8 ml 96% ethanolu a 27,2 ml destilované vody.

5. Měření objemů:

Při práci s roztoky je velmi důležitou veličinou objem. Podle toho, s jakou přesností je třeba objem odměřovat, se volí způsob měření. K odměřování větších objemů se používají odměrné válce, odměrné baňky a dělené i nedělené pipety. Pokud je třeba odměřit objemy s přesností na mikrolitry, používají se dávkovací mechanické mikropipety.

Mikropipety jsou přesně kalibrovány, je nutné s nimi opatrně zacházet a dodržovat tyto zásady:

- Mikropipety slouží k odměřování pouze takových objemů, které dovolují jejich rozsahy určené výrobcem a uvedené na pipetě.
- Před nasátím požadovaného objemu kapaliny mikropipetou se nejprve pomocí otáčecí stupnice nastaví objem, který se bude nabírat. Různé pipety mají různé systémy

nastavování těchto objemů. Je nutné zejména dávat pozor u těch mikropipet, u kterých je otáčecí stupnice zajišťována posuvným zámkem (Nichiryo, Biohit), aby nedošlo k poškození pipety nastavováním objemu v zajištěné pozici.

- Pipeta se uchopí do ruky tak, aby bylo možné palcem pohodlně obsluhovat jak píst sloužící k nasávání a vypouštění kapaliny, tak páčku pro vyhození použité špičky. Pipeta se drží stále v přibližně svislé poloze. Pipeta s nasátou kapalinou se nikdy nepokládá do horizontální polohy, protože by mohlo dojít k natečení kapaliny do vnitřních částí pipety a k jejímu poškození či zničení!
- Na pipetu se nasadí vždy pouze příslušná špička, která je pro ni určená! Běžně používané špičky mají tři barvy: bílou (objemy do 10 ul), žlutou (objemy do 100 až 200 ul) a modrou (objemy do 1 ml).
- Při pipetování se píst mikropipety stlačí do první (horní) polohy. Špička se ponoří pod hladinu kapaliny (1-2 mm v případě bílé špičky, 2-4 mm u žluté špičky a 3-6 mm u modré špičky) a píst se při nasávání kapaliny pomalu vrací do původní polohy. Píst se pouští pomalu, nesmí se rychle pustit do původní polohy, protože by mohlo dojít k nasátí kapaliny do vnitřních částí pipety a k jejímu poškození či zničení!
- Po nasátí se špička ponechá ještě asi 1 až 2 vteřiny v roztoku (u viskózních kapalin déle), aby byla jistota, že se do špičky dostal opravdu celý požadovaný objem kapaliny. Pokud je potřeba, špička se po vytažení z kapaliny nechá ještě okapat.
- Jestliže se při pipetování dostane do špičky vzduchová bublina, kapalina se vypustí a znovu se pomalu nasaje. Pokud se objeví ve špičce opět bublina, je vhodné použít novou špičku.
- Vypouštění kapaliny z pipety se provádí tak, že se konec špičky přiloží na stěnu nádoby (kádinky, zkumavky apod.) a píst se stlačí do první polohy. Píst se v této poloze podrží 1 vteřinu (bílá špička), 1-2 vteřiny (žlutá špička) a 2-3 vteřiny (modrá špička). Při pipetování viskózních kapalin se píst drží v této poloze o něco déle. Potom se píst stlačí do druhé (dolní) polohy, aby se vytlačil i zbytek kapaliny a vypustil tak co nejpřesnější objem.
- V této poloze se špička vytáhne z kapaliny a píst se pomalu vrátí do původní polohy. Opět platí, že píst se nesmí pustit, aby jej do původní polohy nevymrštila pružina, protože by mohlo dojít k nasátí kapaliny do vnitřních částí pipety a k jejímu poškození či zničení!
- Páčkou pro odhazování špiček se použitá špička odstraní, nasadí se nová špička a pipeta je připravena k dalšímu odměřování kapaliny. Výměna špiček je nutná a představuje určitou prevenci jednak znečištění různých roztoků, ale i vzájemné kontaminace vzorků.

6. Centrifugace:

Pro dokonalé rozdělení odlišných fází ve směsích je často nutné tyto vzorky centrifugovat. Pevné částice rozptýlené v kapalině je tedy možné separovat centrifugací, během níž působí na daný směsný vzorek odstředivá síla, tzv. relativní centrifugační síla (přetížení) – rcf. Tato síla je přímo úměrná druhé mocnině počtu otáček rotoru za minutu a vzdálenosti vzorku od osy otáčení (poloměru rotoru).

Výpočet relativní centrifugační síly: $rcf = 1,118 \cdot r \cdot (n / 1000)^2$

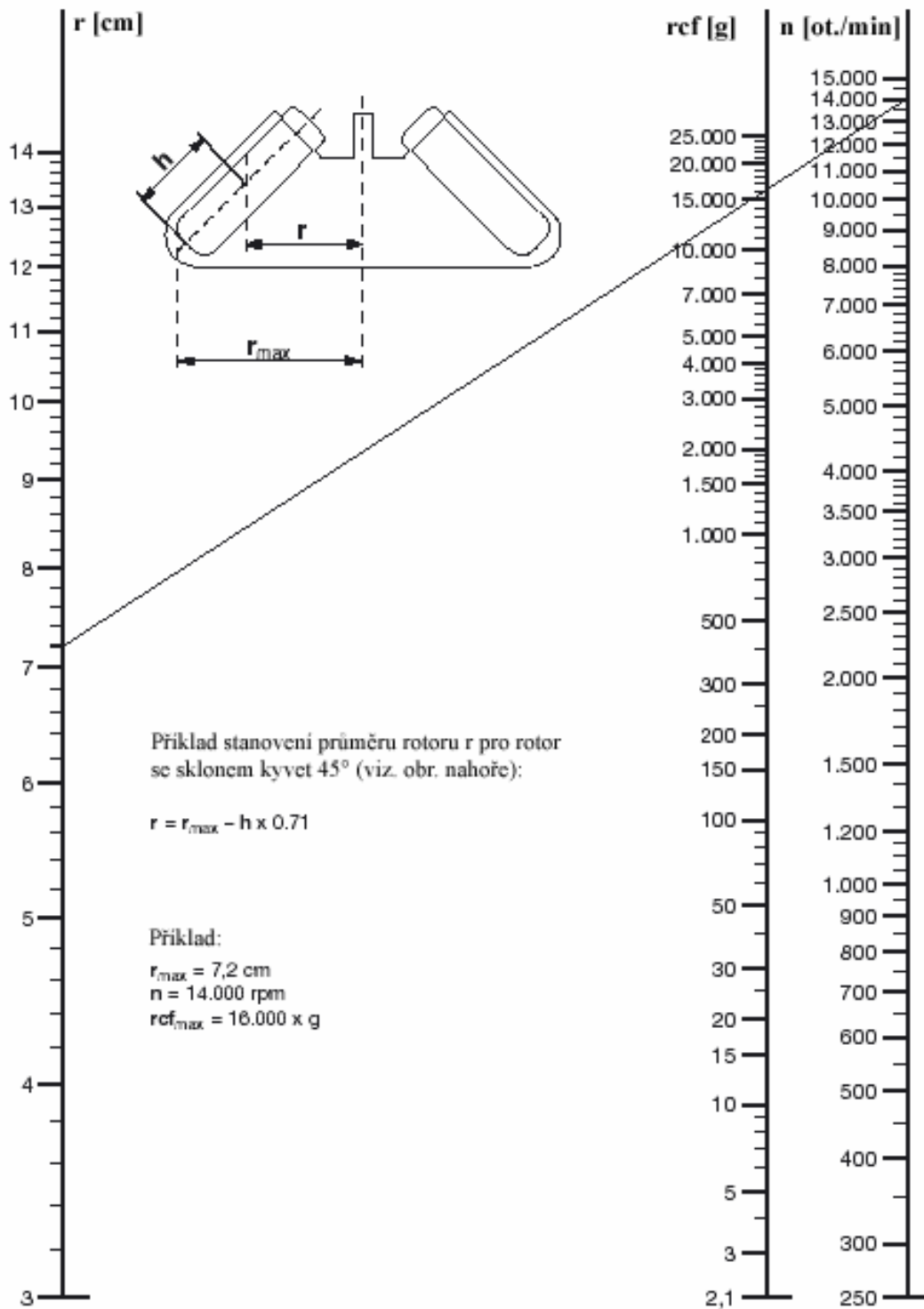
Výpočet počtu otáček n: $n = 946 \cdot (rcf / r)^{-1/2}$

Pozn.: n - počet otáček za minutu (angl. rpm)

rcf - centrifugační síla v násobcích g ($g = 9,81 \text{ ms}^{-2}$)

r - poloměr rotoru v mm

Relativně přesný vzájemný převod otáček centrifugy a relativní centrifugační síly lze také odečíst z nomogramu (Obr. 1).



Obr. 1: Nomogram pro přepočítání relativní centrifugační síly (rcf) a otáček rotoru za minutu (n) v závislosti na poloměru rotoru (r).

II. Návod k praktickým cvičením:

Nukleové kyseliny:

DNA:

Deoxyribonukleová kyselina představuje základní genetický materiál většiny živých organismů. Její nejběžnější struktura je pravotočivá dvoušroubovice a skládá se ze dvou polynukleotidových řetězců opačné orientace zatočených ve spirálách kolem centrální osy. Oba řetězce jsou vzájemně vázány dvěma vodíkovými vazbami mezi bázemi adeninem (A) a thyminem (T) a třemi mezi cytosinem (C) a guaninem (G). Kostru každého řetězce tvoří zbytky deoxyribosy a kyseliny fosforečné, dovnitř šroubovice směřují jednotlivé báze.

DNA u prokaryot je v bakteriálním chromozomu a v plazmidech, u rostlin v buněčném jádře, chloroplastech a mitochondriích, u živočichů a člověka v buněčném jádře a v mitochondriích. DNA lze izolovat buď jako celkovou genomickou DNA, nebo podle potřeby konkrétní typ DNA.

Prvním důležitým krokem pro další laboratorní postupy v molekulární biologii je izolace DNA. Rychlá a účinná metoda izolace DNA umožňuje dále efektivně využívat vysoce specifické techniky jako jsou např. polymerázová řetězová reakce (PCR), délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP), náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD), analýza mikrosatelitové DNA a DNA fingerprinting. Tyto a samozřejmě další metody molekulární biologie se používají zejména v lékařské diagnostice dědičných onemocnění, ale i ve fyto-sanitární a veterinární diagnostice. Molekulární techniky dále nachází uplatnění např. při zhotovování fyzikálních genomových map, v genomovém inženýrství a v dalších biologicko-medicinálních vědních oblastech.

Pro izolaci DNA lze vybrat metodu z celé řady postupů. Volba konkrétní metody závisí jednak na typu použitého biologického materiálu určeného k izolaci DNA, dále na rychlosti, účinnosti metody a finančních možnostech pracoviště. Postup izolace DNA probíhá vždy v několika základních krocích:

- homogenizace biologického materiálu zejména u rostlinných buněk a pevných tkání
- lyze buněčných stěn, cytoplazmatických a jaderných membrán a denaturace proteinů pomocí lyzačního pufru. Jeho nezbytnou součástí je kyselina etylendiaminotetraoctová (EDTA), která působí jako chelatační látka tvořící komplexy s dvojvalnými kationty (např. Ca^{2+}). Pokud by tyto ionty, kofaktory vnitrobuněčných nukleáz (enzymy štěpící nukleové kyseliny), nebyly vyvázané do komplexů, zůstaly by tyto enzymy aktivní, a izolovanou DNA by v pufru rozštěpily. Další důležitou složkou je detergent napomáhající denaturaci proteinů (např. SDS – z angl. sodium dodecyl sulphate – laurylsíran sodný).
- degradace proteinů pomocí proteinázy K – aplikuje se v případě potřeby získat vysoce čistou DNA bez proteinů
- odstranění proteinů a polysacharidů např. pomocí 5M octanu draselného nebo velmi účinnou směsí fenol:chloroform
- vysrážení DNA 70% ethanolem a její promytí
- rozpuštění DNA v TE pufru a její uchování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

RNA:

Molekula ribonukleové kyseliny je tvořena jedním polynukleotidovým řetězcem ribonukleotidů ATP, CTP, GTP a UTP. Kostru řetězce tvoří zbytky ribosy a kyseliny fosforečné. Podle funkce, které RNA v buňkách zastávají, rozlišujeme tři typy RNA: transferová RNA (tRNA, Mr kolem 26 000, tj. přibližně 80 nukleotidů), ribosomální RNA (rRNA, Mr 60 000 – 120 000) a mediátorová RNA (mRNA, mol. hmotnost 100 000 – 500 000). Všechny tyto RNA jsou syntetizovány podle předlohy DNA v procesu transkripce. RNA se vyskytuje především v cytosolu.

Prvním významným krokem pro využití RNA v molekulární biologii je její izolace. RNA je možné izolovat různými metodami. Volba konkrétní metody je závislá nejen na typu použitého biologického materiálu, ale i na rychlosti izolace, účinnosti metody a dostupné finanční možnosti.

Po izolaci může být RNA zpětně přepsána na cDNA a to pomocí reverzní transkriptázy. Metoda izolace RNA je základem pro další aplikaci molekulárních metod, např. Northern blottingu, při konstrukci cDNA knihoven, v diagnostice a studiu RNA virů.

Úkol č. 1: Izolace plazmidové DNA z bakterií

Klíčová slova: plazmid

Úvod: Bakterie mají extrachromozomální DNA v plazmidech, což jsou malé kruhové molekuly dsDNA, které se liší velikostí, způsobem replikace, počtem kopií na bakteriální buňku, schopností množení v různých bakteriích, schopností přenosu mezi bakteriemi aj. Plazmidy obsahují geny, které nejsou nezbytné pro životní funkce. Nesou hlavně geny rezistence vůči antibiotikům, mutagenům, těžkým kovům, bakteriofágům nebo geny pro produkci restrikčních enzymů, toxinů, geny virulence a geny umožňující transfer DNA mezi bakteriemi. Nejvíce poznaná bakterie je *Escherichia coli*, má řadu kmenů, používá se na klonování, manipulaci a přenos specifických DNA sekvencí. Všechny komerční plazmidové vektory mají klonovací místo, tj. restrikční místo, do kterého se vkládá inzert a selektovatelný marker. Pokud je nutné určitý segment DNA amplifikovat, lze jej inkorporovat do plazmidu, pomocí bakterií namnožit a potom izolovat.

Biologický materiál: *Escherichia coli*

Chemikálie a použité roztoky:

GET pufr

lysozym

lyzační roztok (alkalický roztok SDS)

neutralizační roztok

izopropanol

80% ethanol

TE pufr (pH 7,6)

7,5M octan amonný

96% ethanol

RNaza

equilibrovaný fenol

5M NaCl

směs chloroform : izoamylalkohol (24:1)

3M octan sodný (pH 5,5)

Pomůcky: mikropipety, špičky, skleněné tyčinky, centrifugační kyvety

Přístroje: centrifuga, analytické váhy

Postup:

Lyze:

- 1) Bakteriální kulturu centrifugovat v kyvetách 10 min. při 3 000g ve 4 °C.
- 2) Pelet důkladně resuspendovat v pufru GET (objem stanovit podle velikosti peletu, asi 4 ml, zapsat si jej). U bakterií s pevnou stěnou přidat 6 µg lysozymu a inkubovat 1 min. při pokojové teplotě.
- 3) Přidat 8 ml alkalického roztoku SDS (tj. 2 objemy GET) a dobře tyčinkou promíchat. Inkubovat v ledu 30 min.
- 4) Přidat 3 ml neutralizačního roztoku (tj 0,75 objemu GET) a dobře tyčinkou promíchat. Inkubovat v ledu 30 min.
- 5) Centrifugovat 10 min. při 15 000g ve 4 °C.

Vysrážení DNA:

- 6) Supernatant přelít přes gázu do čisté kyvety, přidat 9 ml izopropanolu (tj. 0,6 objemu z celkového objemu 15 ml). Nechat 30 min. srážet při pokojové teplotě.
- 7) Centrifugovat 10 min. při 12 000g ve 4 °C.
- 8) Sediment opláchnout vychlazeným 80% ethanolem a vysušit.
- 9) Sediment rozpustit ve 2 ml TE pufru.

Přečištění:

- 10) Přidat stejný objem 7,5M octanu amonného a inkubovat 30 min. v ledu.
- 11) Centrifugovat 10 min. při 15 000g ve 4 °C.
- 12) Supernatant přelít do čisté kyvety a přidat 2 objemy vychlazeného 96% ethanolu. Inkubovat 1 hod. při -20 °C.
- 13) Centrifugovat 10 min. 15 000g ve 4 °C.
- 14) Sediment opláchnout vychlazeným 80% etanolem a opatrně vysušit.
- 15) Pelet rozpustit v 1ml TE pufru a přidat 0,01 objemu RNazy (10 µl). Inkubovat 1 hod. při pokojové teplotě nebo 20 min. při 37 °C.
- 16) K roztoku přidat 0,5 objemu equilibrovaného fenolu (500 µl) a dobře promíchat. Přidat 50 µl 5M NaCl a promíchat. Přidat 0,5 objemu (500 µl) směsi chloroform : izoamylalkohol (24:1) a promíchat.
- 17) Centrifugovat 2 min. při 15 000g.
- 18) Odebrat vodní fázi a přidat 1 objem směsi chloroform : izoamylalkohol (24:1) a dobře promíchat.
- 19) Centrifugovat 2 min. při 15 000g.
- 20) Purifikaci DNA opakovat od bodu 18) dokud nebude rozhraní čisté, nejméně 3 krát.
- 21) K vodní fázi přidat 0,1 objemu 3M octanu sodného (pH 5,5) a promíchat.
- 22) K roztoku přidat 2-3 objemy vychlazeného 96% ethanolu a inkubovat 1 hod. při -20 °C.
- 23) Centrifugovat 10 min. při 15 000g ve 4 °C. Supernatant opatrně vylít, sediment opláchnout vychlazeným 80% etanolem a vysušit.
- 24) Pelet rozpustit v minimálním objemu TE pufru (pH 7,6) (100-500 µl).

Poznámky: Nepřečištěnou plazmidovou DNA (bod 9) lze použít na kontrolu přítomnosti inzertu pomocí elektroforézy.

Úkol č. 2: Transformace kompetentních bakterií

Klíčová slova: transformace – přenos cizí DNA do bakterií

Úvod: Nejvíce poznaná bakterie je *Escherichia coli*, má řadu kmenů, používá se na klonování DNA. Komerčně jsou dostupné plazmidy nesoucí gen Amp pro β -laktamázu, který inaktivuje hydrolytickým účinkem antibiotikum Ampicilin. Zároveň mají jenom jedno klonovací místo, ve kterém můžeme plazmid rozstřípnout restriční endonukleázou a vložit náš fragment DNA, který chceme klonovat. Po vysetí transformovaných buněk na medium porostou pouze ty, které obsahují plazmid s genem rezistence. Nemusí však dojít k přenosu plazmidu i s našim segmentem DNA. Proto musíme provést kontrolu, zda došlo k přenosu. Klonovací místo se nachází uprostřed genu pro β -galaktosidázu *lac Z*. Tento enzym štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. Je-li gen přerušen vloženým segmentem, bakterie ztrácí schopnost využívat laktózu z media, čehož můžeme využít při tzv. modrobílé selekci transformovaných bakterií. Přidáním speciálního substrátu x-gal do media a induktoru exprese genu *lac Z* (IPTG) můžeme bakterie barevně rozlišit. Substrát rozštěpený β -galaktosidázou má modrou barvu, bakterie s vloženým inzertem a nefunkčním *lacZ* genem jsou bílé.

Biologický materiál: *E.coli* XL1 blue MRF', plazmid *blue script*

Chemikálie a použité roztoky:

kompetentní bakterie na mediu SOB

TFB pufr pH 7,5

DMSO+DDT

DNA nesoucí gen rezistence

LB medium tekuté s 1% glukózou

LB agarové medium s ampicilinem a X-gal (5-bromo-4 chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid)

IPTG (izopropyl-1-thio- β -D-galaktosid)

Pomůcky: mikropipety, zkumavky, mikrozkuřavky

Přístroje: termostat, vodní lázeň, laminární box

Postup:

- 1) Bakterie *E.coli* naočkovat na SOBMg medium a kultivovat přes noc při 37 °C.
- 2) Narostlé kolonie seškrábnout sterilní bakteriální kličkou a suspendovat v 200 μ l vychlazeného TFB pufru. Každý student pracuje se 2 zkumavkami.
- 3) Přidat 7 μ l DMSO+DDT a inkubovat 20 min. na ledě.
- 4) Přidat 7 μ l DMSO+DDT a inkubovat 15 min. na ledě.
- 5) Přidat 1 μ l DNA a inkubovat 40 min. na ledě. Ke kontrolní variantě DNA nepřidávat.
- 6) Vzorky kultur zahřívát 2 min. při 42 °C.
- 7) Přidat 800 μ l LB media s 1% glukózou a inkubovat 1-2 hod. při 37 °C. 100 μ l kultury roztříť na selekční media s antibiotikem a kultivovat minimálně 1 den při 37 °C.

Poznámky: Pracovat sterilně, všechny kontaminované věci a kultury po skončení cvičení likvidovat v autoklávu. Po kultivaci vyhodnotit růst transformovaných bakterií a růst kontrolní varianty. Pokud se přenos plazmidu zdařil, transformované buňky porostou i na mediu s ampicilinem a budou bílé.

Úkol č. 3: Izolace deoxyribonukleoproteinů ze sleziny vysolovací metodou

Klíčová slova: deoxyribonukleoprotein (DNP)

Úvod: DNA je v buňce vázána s bílkoviny ve formě deoxyribonukleoproteinů (DNP). Pro jeho izolaci se nejčastěji používají tkáně obsahující buňky s velkými jádry (např. brzlík, slezina, mlíčí ryb). Extrakce se provádí 1M roztokem NaCl. Po zředění se vysráží DNP jako vláknitý produkt. Během izolace může dojít ke změnám struktury DNP, např. v koncentrovaných roztocích solí dojde k separaci bílkovinné složky nebo při extrakci nastává depolymerace vlivem nukleáz, jejichž aktivita nebyla dostatečně inhibována.

Tato metoda neslouží k izolaci čisté DNA, ale pouze k separaci DNP od ostatních částí zhomogenizované tkáně. Vyizolovaný DNP je výchozím produktem pro izolaci DNA.

Biologický materiál: slezina z prasete domácího (*Sus domesticus*)

Chemikálie a roztoky:

1 M NaCl

destilovaná voda

Pomůcky: porcelánové třecí misky s tloučky, nože, 50 – 100 ml odměrné válce, centrifugační kyvety, 600 – 1 000 ml kádinky nebo Erlenmayerovy baňky, 50–100 ml kádinky, mořský písek, lžičky, špejle

Přístroje: centrifuga, laboratorní váhy

Postup:

- 1) Třecí misku umístit do ledové tříště, aby byla dobře chlazená.
- 2) Slezinu zbavit povrchové blány. Asi 1g sleziny dobře rozetřít s trochou mořského písku v třecí misce.
- 3) Do směsi za neustálého roztírání přidat 30 ml 1 M NaCl.
- 4) Viskózní roztok, který vznikne, nalít do centrifugační kyvety. Dvojici kyvet vyvážit na stejnou hmotnost. (Do kyvety, která má menší hmotnost se přidá tolik 1M NaCl, aby se hmotnosti obou kyvet rovnaly.) Vyvážené kyvety vložit do protilehlých poloh rotoru centrifugy.
- 5) Centrifugovat 10 min při 5 000g při 4 °C. Centrifugu předem vychladit na 4 °C.
- 6) Supernatant slít do kádinky, změřit jeho objem a za stálého míchání špejlí přilévat velmi pomalu do šestinásobného množství vychlazené destilované vody. DNP se vysráží ve formě vláken. Sraženinu DNP je možné navíjet na špejli.

Poznámky:

- 1) Pokud není k dispozici centrifuga, lze pro oddělení roztoku DNP od písku a zbytků buněk použít alternativní postup. Místo centrifugace se viskózní roztok z třecí misky přelije do kádinky přes několikrát přeloženou gázu a dále se pokračuje bodem 6).
- 2) Hlavní podmínkou pro zdárný průběh pokusu je neustálé chlazení biologického materiálu v ledové tříšti, jinak dojde k degradaci DNP nukleázami a DNP by se v závěrečné fázi nevysrážel.

Úkol č. 4: Izolace genomové DNA z listů tabáku

Klíčová slova: DNA (deoxyribonukleová kyselina)

Úvod: Izolace DNA vždy probíhá v několika stupních. U rostlinného materiálu určeného k izolaci DNA se nejdříve musí provést jeho důkladná homogenizace. Dalším krokem je lyze buněčných stěn a organel, následuje vysrážení proteinů a polysacharidů. Dalšími důležitými stupni je srážení DNA, její rozpuštění a eventuální zamražení.

Biologický materiál: listy tabáku (*Nicotiana sp.*)

Chemikálie a použité roztoky:

lyzační pufr - těsně před použitím přidat 40 µl 2-merkaptoetanolu na 10 ml tohoto pufru
5M octan draselný
izopropanol
70% ethanol
TE pufr (pH 8)

Pomůcky: nůžky, porcelánové třecí misky s tloučky, 10 ml centrifugační zkušavky, plastové tyčinky, ledová tříšť, 5 ml skleněné pipety, 10 ml odměrné válce, mikropipety, špičky, parafilm, 1,5 ml mikrozkušavky

Přístroje: laboratorní váhy, chlazená centrifuga, vodní lázeň (+65 až 70 °C), centrifuga, koncentrátor DNA SpeedVac (ThermoSavant)

Postup:

Homogenizace rostlinného materiálu:

- 1) Odebrat a navážit 1g mladších listů z rostlin tabáku.
- 2) Listy nastříhat do předchlazené (4 °C) porcelánové třecí misky umístěné v ledové tříšti a homogenizovat s 5 ml lyzačního pufru na jemnou kaši.

Lyze buněčných stěn a organel:

- 3) Obsah třecí misky kvantitativně přelít pomocí tyčinky do 10 ml centrifugační zkušavky. Třecí misku a paličku opláchnout 1 ml lyzačního pufru a přidat k homogenátu do zkušavky.
- 4) Homogenní směs promíchat tyčinkou a inkubovat 10 až 20 min. ve vodní lázni při 68-75 °C.

Odstranění proteinů a polysacharidů:

- 5) Po inkubaci přidat k suspenzi 2 ml 5M octanu draselného, zamíchat a nechat srážet asi 20 min. na ledové lázni.
- 6) Kyvety přesně vyvážit a umístit v centrifuze proti sobě. (Kyvety umístěné proti sobě musí mít stejnou hmotnost, protože pak mají jejich vektory hybnosti stejnou velikost, ale opačný směr, takže se jejich silové působení na rotor během centrifugace vzájemně ruší.) Centrifugovat 15 min. při 5 000 g při 4 °C. Centrifugu je nutné předem vychladit.

Vysrážení DNA:

- 7) Opatrně odebrat 2 ml horní vodní fáze do nové centrifugační zkušavky tak, aby nedošlo k přenesení plovoucích zelených zbytků rostlin nebo sedimentu. V odměrném válci změřit objem zbytku vodní fáze pro výpočet výtěžnosti DNA.
- 8) Ke 2 ml odebrané vodní fáze přidat 1,2 ml předchlazeného (-20 °C) izopropanolu (tj. 0,6 celkového objemu), promíchat převrácením zkušavky utěsněné parafilmem a

nechat srážet 30 min. při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ve zkumavce lze pozorovat vytvářející se bílá vlákna srážené DNA. Pokud se vlákna nevytvářejí, přidat ještě 1 ml izopropanolu.

- 9) Zkumavky s vysráženou DNA dokonale vyvážit a centrifugovat 5 min. při 5 000 g při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 10) Supernatant opatrně vylít a sediment opláchnout vychlazeným 70% ethanolem a přepipetovat do 1,5 ml mikrozukavky a opět centrifugovat 5 min. při 13 000 g.
- 11) Po centrifugaci 70% ethanol opatrně slít, aby sediment zůstal na dně mikrozukavky a 20 min. vysušit ve vakuové centrifuze.

Rozpouštění DNA a její zamražení:

- 12) DNA důkladně rozpustit ve 400 ul TE pufru a zamrazit při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Úkol č. 5: Izolace genomové DNA z ptačí krve fenol-chloroformovou metodou

Klíčová slova: DNA (deoxyribonukleová kyselina)

Úvod: DNA je pomocí této metody izolována z erythrocytů ptačí krve. Izolace DNA probíhá v několika stupních. Důležitým krokem je lyze cytoplazmatických a jaderných membrán a organel, následuje vysrážení proteinů a polysacharidů. Dalšími stupni je srážení DNA, její rozpouštění a eventuální zamražení. Tato metoda je vhodnou metodou volby pro izolaci neporušené genomické DNA, kterou je nutné získat za účelem následovných aplikací některých dalších molekulárních technik (např. DNA fingerprinting).

Biologický materiál: ptačí krev

Chemikálie a použité roztoky:

Queen's lyzační pufr (pH 7,5)

proteináza K

10% laurylsíran sodný (SDS)

equilibrovaný fenol (pH 8)

chloroform

3M octan sodný

izopropanol

70% ethanol

TE pufr (pH 8)

Pomůcky: stojánek, 1,5 ml mikrozkušavky, mikropipety, špičky, skleněné tyčinky, ochranné gumové rukavice

Přístroje: termostat (37- 45 °C), centrifuga

Postup:

1. den:

Lyze cytoplazmatických membrán, buněčných organel a natrávení proteinů:

- 1) Do mikrozkušavek přenést pomocí mikropipety s ustříženou špičkou 500 ul vzorku krve v pufru Queen's, přidat 100 ul proteinázy K (10 mg/ml) a 100 ul 10% roztoku SDS a opatrně promíchat překlápěním.
- 2) Mikrozkušavky se vzorky inkubovat za mírného překlápění či třepání přes noc v termostatu při 37- 40 °C.

2. den:

Odstranění proteinů a polysacharidů:

- 3) Ke každému vzorku přidat 700 ul směsi fenol-chloroform (1:1), asi 5 min. opatrně zlehka překlápět a následovně centrifugovat 15 min. při 13 000 g.
- 4) Po centrifugaci odebrat ze vzorků pomocí mikropipety s ustříženou špičkou pouze horní vodnou fázi (DNA) do nové mikrozkušavky. Ke vzorkům přidat 500 ul chloroformu, opatrně promíchat překlápěním a centrifugovat 15 min. při 13 000 g.
- 5) Opět odebrat pomocí mikropipety s ustříženou špičkou horní vodnou fázi do nové mikrozkušavky tak, aby nedošlo k nasátí mezifáze obsahující proteiny.
- 6) Ke vzorkům přidat 700 ul chloroformu, zlehka překlápět a centrifugovat 15 min. při 13 000 g.

Vysrážení DNA:

- 7) Pomocí mikropipety s ustřiženou špičkou odebrat opět horní fázi do nové mikrozkušavky, přidat 150 μ l 3M octanu sodného a 700 μ l izopropanolu vychlazeného na -20°C . Zkušavku překlápět tak dlouho, dokud se v roztoku neobjeví sraženina DNA.
- 8) Sraženinu DNA namotat na skleněnou tyčinku, omýt 70% ethanolem v mikrozkušavce. Nechat 5 min. oschnout na vzduchu ve stojánku ve svislé poloze. Suchá DNA je sklovitě průhledná.

Rozpouštění DNA a její zamražení:

- 9) DNA na tyčince přenést do mikrozkušavky s 500 μ l TE pufru tak, aby se DNA uvolnila do pufru.
- 10) DNA v TE pufru důkladně rozpustit v termostatu při $37 - 45^{\circ}\text{C}$. Po dokonalém rozpouštění lze vzorky zamrazit při -20°C a uchovat je tak delší dobu.

Úkol č. 6: Měření koncentrace DNA

Klíčová slova: spektrofotometr, fluorometr, absorbance

Úvod: Veškeré chemické reakce, včetně laboratorní práce s DNA, probíhají v určitých objemech a za určitých koncentrací látek. Pro následující laboratorní práci s vyizolovanou DNA je důležité znát její koncentraci v příslušném vzorku. Stanovení koncentrace DNA se provádí nejčastěji spektrofotometricky a fluorometricky.

Při spektrofotometrických stanoveních se měří veličina, která se nazývá absorbance (A). Ta charakterizuje intenzitu absorpce (pohlčení) záření v látce o jednotkové tloušťce (1 cm kyveta). Absorbance se rovná zápornému dekadickému logaritmu transmitance (propustnosti). Absorbance je veličinou bez jednotky.

Při měření koncentrace DNA platí:

$A(260\text{ nm}) = 1, c(\text{dsDNA}) = 50\text{ }\mu\text{g/ml H}_2\text{O}$

$A(260\text{ nm}) = 1, c(\text{ssDNA}) = 33\text{ }\mu\text{g/ml H}_2\text{O}$

Pro maximální přesnost měření by měla být koncentrace vzorku v kyvetě taková, aby hodnoty absorbancí vycházely mezi 0,1 a 1,0. V tomto rozmezí vykazuje kalibrační křivka vysokou linearitu.

Koncentraci DNA v daném vzorku lze stanovit několika způsoby:

1) zjištění koncentrace DNA změřením A (260 nm) a A (280 nm):
 $c\text{ DNA} = 62,9 \times A(260\text{ nm}) - 36,0 \times A(280\text{ nm}) \quad [\mu\text{g/ml}]$

2) zjištění koncentrace DNA změřením A (230 nm) a A (260 nm):
 $c\text{ DNA} = 49,1 \times A(260\text{ nm}) - 3,48 \times A(230\text{ nm}) \quad [\mu\text{g/ml}]$

3) pomocí nomogramu (obr. 2)

Chemikálie a roztoky:

vzorky DNA

TNE pufr

destilovaná voda

barvivo Hoechst 33258

Pomůcky: kádinky, mikropipety, ústřížky buničité vaty, ochranné gumové rukavice, kyveta pro spektrofotometr z křemenného skla, kyveta pro fluorometr

Přístroje: spektrofotometr, fluorometr

Postup:

- 1) U předložených vzorků DNA změřit na spektrofotometru hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm (návod je přiložen u přístroje).
- 2) Podle postupů 1) až 3) výše uvedených vypočítat koncentraci DNA. Změřit koncentraci DNA všech předložených vzorků na fluorometru (návod je přiložen u přístroje).
- 3) Porovnat hodnoty koncentrací DNA získaných různými způsoby a zhodnotit přesnost a spolehlivost použitých postupů.

Poznámky: Při měření na fluorometru používat gumové rukavice, protože barvivo Hoechst 33258, které se přidává do TNE pufru je mutagen a karcinogen!

Úkol č. 7: Měření čistoty DNA

Klíčová slova: spektrofotometr

Úvod: Při aplikaci jakékoliv metody izolace DNA se nikdy nepodaří vyizolovat z buněk čistá DNA, ale vždy znečištěná dalšími komponentami jako jsou zejména proteiny a polysacharidy. Dalším nutným krokem v laboratorní práci s DNA je její purifikace (vyčištění). Protože většina technik molekulární biologie je často úspěšná pouze při použití čisté DNA, je tedy nezbytné stanovit čistotu vyizolované DNA. Nejrychlejší a nejschůdnější cestou je změření absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Z těchto hodnot je potom možné zjistit nejen čistotu DNA, ale i její koncentraci v roztoku, a také koncentraci znečišťujících proteinů.

Při měření čistoty DNA platí:

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) \in \langle 1,7; 1,8 \rangle$ čistá DNA

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) < 1,7$ znečištěná DNA (proteiny nebo organické látky)

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) > 1,9$ DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami

Koncentraci znečištění roztoku DNA proteiny v daném vzorku lze stanovit několika způsoby:

1) zjištění čistoty DNA změřením $A(260 \text{ nm})$ a $A(280 \text{ nm})$:

$c \text{ proteiny} = 1552,0 \times A(280 \text{ nm}) - 757,3 \times A(260 \text{ nm})$ [μg/ml]

2) zjištění čistoty DNA změřením $A(230 \text{ nm})$ a $A(260 \text{ nm})$:

$c \text{ proteiny} = 183,0 \times A(230 \text{ nm}) - 75,8 \times A(260 \text{ nm})$ [μg/ml]

3) pomocí nomogramu (Obr. 2)

Chemikálie a roztoky:

vzorky DNA

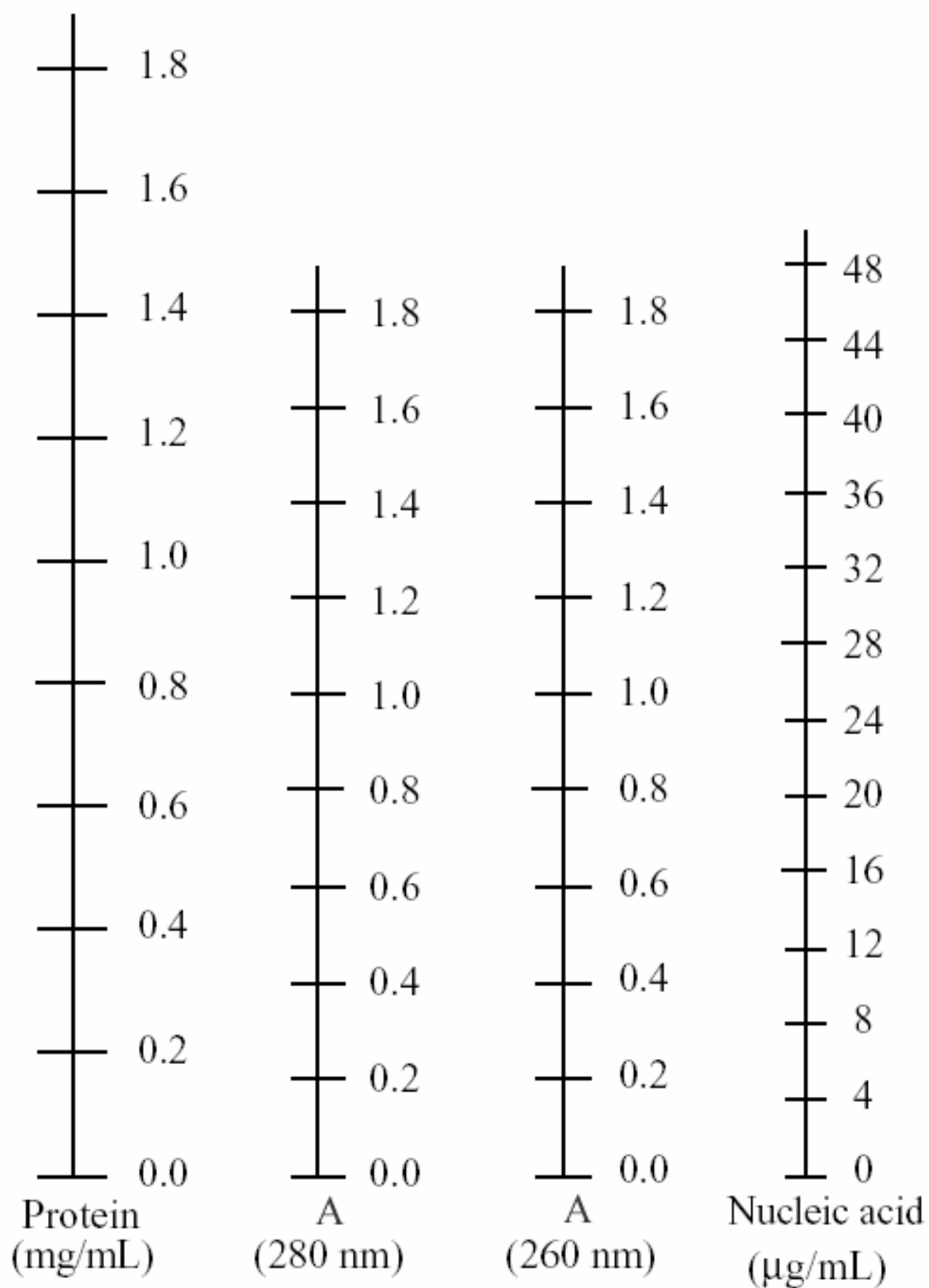
destilovaná voda

Pomůcky: kádinky, mikropipety, špičky, ústřížky buničité vaty, kyveta pro spektrofotometr z křemenného skla

Přístroje: spektrofotometr

Postup:

- 1) U předložených vzorků DNA změřit na spektrofotometru hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm (návod je přiložen u přístroje).
- 2) Vypočítat podíly $A(260) / A(280)$ pro jednotlivé vzorky a rozhodnout, jaká je jejich čistota.
- 3) Vypočítat oběma způsoby viz 1) a 2) znečištění roztoku DNA proteiny.
- 4) Porovnat hodnoty koncentrací proteinů získaných výpočtem a pomocí nomogramu (Obr.2) a zhodnotit přesnost a spolehlivost použitých postupů.



Obr.2: Nomogram pro určení koncentrace DNA a proteinů ve vzorku pomocí absorbancí při 260 a 280 nm.

Úkol č. 8: Separace nukleových kyselin pomocí elektroforézy v agarózovém gelu

Klíčová slova: DNA, elektroforéza, agarózový gel, ethidiumbromid

Úvod: Elektroforéza je separační elektromigrační analytická metoda. Tato metoda spočívá v rozdělení molekul ze směsi podle jejich velikosti, respektive podle jejich molekulové hmotnosti stejným směrem elektrickým proudem.

Molekuly DNA mají záporný náboj, a proto v elektrickém poli putují od záporné elektrody ke kladné. Pohybují se v agarózovém gelu, který funguje jako trojrozměrné síto, kterým musí molekuly DNA migrovat ke kladné elektrodě. Velikost pórů v gelu závisí na jeho koncentraci a ta se volí podle předpokládané velikosti fragmentů DNA, které mají být děleny.

Elektroforéza probíhá v příslušném pufru v elektroforetické komůrce. Pufř jednak udržuje optimální pH reakce, vede elektrický proud a pomáhá při udržování stálé teploty.

Jednotlivé vzorky DNA se nanášejí na gel do jamek společně s nanášecím roztokem a s barvivem (např. bromfenolová modř). Nanášecí roztok obsahuje kapalinu o vyšší hustotě než voda (např. glycerol) a to proto, aby vzorky po nanesení na gel zůstaly v jamkách. Barvivo umožňuje zjistit, jak rychle se fragmenty DNA po spuštění elektroforézy pohybují a v jaké vzdálenosti od startu se v daném okamžiku nacházejí. Současně s nanášenými vzorky DNA je možné nanést do jedné jamky tzv. marker molekulové hmotnosti, což je směs několika fragmentů DNA o definované velikosti (např. 50bp, 100 bp, 150bp, 200bp), tzn. o konkrétní molekulové hmotnosti. Tento marker umožňuje stanovit velikosti separovaných fragmentů DNA.

Hodnocení výsledků se provádí pomocí transiluminátoru, kdy lze pozorovat separované fragmenty DNA. Vizualizace DNA je založena na specifické vazbě DNA s ethidiumbromidem, který se přidává do pufru nebo přímo do gelu. Komplex ethidiumbromid-DNA při excitaci UV zářením emituje fotony, jejichž vlnová délka leží mezi žlutou a oranžovou částí viditelného spektra, což umožňuje vizualizaci DNA.

Na gelu by měl být patrný jeden proužek velice blízko startu elektroforézy. Pokud nebude DNA degradována, tento vizualizovaný proužek bude jasně zřetelný a ostrý. Pokud ale vzorek DNA bude obsahovat mnoho reziduálních proteinů, bude proužek neostrý. Jestliže během izolace DNA dojde k jejímu značnému porušení až rozbití, na gelu bude patrna souvislá šmouha. RNA, která bude taktéž obsažena ve vzorcích, se bude jevit jako souvisle zbarvená oblast mezi oblastí s bromfenolovou modří a čelem elektroforézy.

Chemikálie a roztoky:

0,7% agaróza v TAE pufru

TAE pufř

ethidium bromid

nanášecí pufř pro agarózové gely

vzorky DNA

destilovaná voda

Pomůcky: kádinky, mikropipety, špičky, láhve pro vaření agarózy, odměrné válce, elektroforetická komůrka, ochranné gumové rukavice

Přístroje: laboratorní váhy, mikrovlnná trouba, zdroj stejnosměrného napětí, UV transiluminátor

Postup:

- 1) Připravit 45 ml 0,7 % roztoku agarózy v TAE pufru. Víčko láhve zlehka dotáhnout a roztok agarózy důkladně rozvařit v mikrovlnné troubě (asi 2 min.), aby vznikl úplně čirý roztok.
- 2) Po dokonalém rozvaření láhev opatrně otevřít (Pozor! Roztok v láhvi je pod tlakem a hrozí nebezpečí opaření!). Obsah přelit do kádinky a přidat 1 μ l ethidiumbromidu, dobře promíchat. (Pozor! Pracovat v ochranných rukavicích, ethidium bromid je mutagen a karcinogen!)
- 3) Roztok agarózy nechat zchladit asi na 60 °C, potom jej nalít do připravené vaničky s vloženým hřebínkem tak, aby se vytvořil gel o výšce asi 0,5-0,8 cm. Pomocí malé plastové pipety odstranit vzduchové bubliny a nechat gel asi 15 min. tuhnout.
- 4) Po dokonalém ztuhnutí gelu opatrně vytáhnout hřebínek a gel vložit do elektroforetické komůrky naplněnou TAE pufrem. Gel musí být umístěn tak, aby jamky pro nanášení vzorků byly blíže ke katodě a to proto, že DNA při elektroforéze migruje směrem k anodě. Celý gel musí být převrstven asi 2-5 mm pufru.
- 5) Vzorky pro elektroforézu připravit promísáním 5 μ l vzorku DNA se 2 μ l nanášecího pufru. Do jamky by mělo být naneseno více jak 10 ng DNA.
- 6) Vzorky nanést do jamek. Nanášení provádět opatrně pomocí mikropipety tak, aby nedošlo k rozlití vzorku mimo jamku.
- 7) Po nanesení všech vzorků uzavřít komůrku víčkem, připojit ke zdroji elektrického napětí s nastavením na 60 V, tzn. 1-5 V/cm gelu. Při správném zapojení se na elektrodách generují bublinky jako produkt elektrolýzy vody a během několika minut začne bromfenolová modř migrovat z jamek směrem k anodě. Elektroforézu nechat běžet asi 30 min., zastavit ji v době, kdy bromfenolová modř urazí 2/3 dráhy.
- 8) Zdroj elektrického napětí vypnout a odpojit kabely.
- 9) Gel opatrně vyjmout, omýt destilovanou vodou a prohlédnout pomocí UV transiluminátoru.

Poznámky:

- 1) Ethidiumbromid je mutagen a karcinogen, a proto je nutné při jakékoliv manipulaci s jeho roztoky či s jím potřísněnými předměty použít ochranné gumové rukavice.
- 2) Ultrafialové (UV) záření je mutagen a karcinogen a při práci s ním je nutné chránit kůži a zrak.
- 3) S elektroforetickou komůrkou manipulovat pouze při vypnutém zdroji a odpojených vodičích, aby nedošlo k úrazu elektrickým proudem.

Úkol č. 9: Izolace RNA pomocí činidla Tri Reagent (fy Sigma)

Klíčová slova: RNA, Tri Reagent

Úvod: Jednou z nejúčinnějších metod izolace RNA je způsob provedený pomocí činidla Tri Reagent (fy Sigma). Tri Reagent je činidlo vhodné pro rychlou simultánní izolaci RNA, DNA a proteinů, které je možné extrahovat i z velmi malého množství tkání a pletiv. Tri Reagent je směsí guanidin thiokyanatanu a fenolu v mono-fázovém roztoku. Při izolaci se homogenizát po přidání chloroformu a centrifugaci rozděluje na tři fáze: vodní fázi obsahující RNA, mezifázi obsahující DNA a organickou fázi obsahující proteiny.

Biologický materiál: tabák (*Nicotiana tabaccum*)

Chemikálie a použité roztoky:

Tri Reagent (fy Sigma)

chloroform

izopropanol

75% ethanol

Pomůcky: třecí misky, mikrozkušavky, stojany na zkumavky, mikropipety, špičky

Přístroje: centrifuga

Postup:

- 1) 0,1 g listu tabáku homogenizovat s 1 ml Tri Reagent (firma Sigma) ve vychlazené třecí misce. Supernatant převést do mikrozkušavky a nechat 10 min. inkubovat při pokojové teplotě.
- 2) Ke vzorku přidat 0,2 ml chloroformu, důkladně 15 s protřepávat a následně nechat 15 min. inkubovat při pokojové teplotě.
- 3) Centrifugovat 15 min. při 12 000g při 4 °C.
- 4) Z horní části supernatantu odebrat 0,2 ml do nové mikrozkušavky a přidat 0,2 ml izopropanolu. Vzorek nechat 10 min. inkubovat při pokojové teplotě.
- 5) Centrifugovat 15 min. při 12 000 g 4 °C.
- 6) Supernatant odstranit a pelet promýt 0,5 ml 75% ethanolem. Centrifugovat 15 min. při 12 000 g při 4 °C.
- 7) Opakovat krok 6.
- 8) Supernatant opět odstranit, k peletu (sediment celkové RNA) přidat 0,5 ml 75% ethanolu a takto upravený vzorek uchovat při teplotě -20 °C.

Úkol č. 10: Izolace celkové RNA pomocí LiCl

Klíčová slova: RNA, LiCl

Úvod: Izolaci RNA lze provádět pomocí LiCl, který je obsažen spolu s EDTA a Tris v lyzačním pufru 2x LETS. Jeho působením dochází k lyzi buněčných stěn, membrán, organel a denaturaci proteinů. Působením směsi fenol:chloroform dochází k odstranění proteinů a polysacharidů. 70% ethanolem se vysráží a promyje RNA. Konečným krokem izolace RNA je její rozpuštění v TE pufru.

Biologický materiál: česnek (*Allium sativum* L.)

Chemikálie a použité roztoky:

2x LETS pufr

fenol (pH 4,3) (Sigma)

chloroform

0,2M LiCl

70% ethanol

96% ethanol

TE pufr

Pomůcky: mikrozkušavky, stojan na zkumavky, mikropipety, špičky

Přístroje: centrifuga, vortex

Postup:

- 1) 0,1 g listu zhomogenizovat pomocí tekutého dusíku v mikrozkušavce do prášku.
- 2) Připipetovat 100μl 2x LETS a 100μl směsi fenol:chloroform (1:1).
- 3) Směs střídavě 1 min vortexovat a protřepávat až do úplného zhomogenizování.
- 4) Centrifugovat při 10 000g po dobu 5 min při 20 °C.
- 5) Supernatant přepipetovat do nové mikrozkušavky a přidat 100μl směsi fenol:chloroform (1:1). Centrifugovat při 10 000 g po dobu 5 min při 20 °C.
- 6) Opakovat krok č. 5 dokud není supernatant úplně čistý.
- 7) Supernatant přepipetovat do nové mikrozkušavky a přidat 100μl 0,2 M LiCl a 300μl 96% ethanolu. Nechat srážet 20 min při -20 °C.
- 8) Centrifugovat při 10 000 g po dobu 5 min při 20 °C.
- 9) Supernatant odstranit a k peletu připipetovat 1 ml 70% ethanolu. Mírně protřepat.
- 10) Centrifugovat při 10 000 g po dobu 5 min při 20 °C.
- 11) Supernatant odstranit, k peletu připipetovat 100μl TE pufru a RNA rozpustit.
- 12) Vzorek RNA uchovat v mrazícím boxu při -20 °C.

Úkol č. 11: Měření koncentrace RNA

Klíčová slova: spektrofotometr, absorbance

Úvod: Veškeré chemické reakce, včetně laboratorní práce s RNA, probíhají v určitých objemech a za určitých koncentrací látek. Pro následující laboratorní práci s vyizolovanou RNA je důležité znát její koncentraci v příslušném vzorku. Stanovení koncentrace RNA se provádí nejčastěji spektrofotometricky.

Při spektrofotometrických stanoveních se měří veličina, která se nazývá absorbance (A). Ta charakterizuje intenzitu absorpce (pohlčení) záření v látce o jednotkové tloušťce (1 cm kyveta). Absorbance se rovná zápornému dekadickému logaritmu transmitance (propustnosti). Absorbance je veličinou bez jednotky.

Při měření koncentrace RNA platí následující:

$A(260\text{ nm}) = 1$, pak $c(\text{ssRNA}) = 40\text{ }\mu\text{g/ml H}_2\text{O}$

Pro maximální přesnost měření by měla být koncentrace vzorku v kyvetě taková, aby hodnoty absorbancí vycházely mezi 0,1 a 1,0. V tomto rozmezí vykazuje kalibrační křivka vysokou linearitu.

Chemikálie a použité roztoky:

vzorky RNA

destilovaná voda

Pomůcky: kádinky, mikropipety, ústřížky buničité vaty, kyveta pro spektrofotometr z křemenného, parafilm

Přístroje: spektrofotometr

Postup:

- 1) Před měřením koncentrace a čistoty RNA vzorky 5 min centrifugovat při 10 000 g a 4°C. Supernatant odstranit mikropipetou a nechat 10 min sušit při laboratorní teplotě.
- 2) Dále pracovat se vzorky na ledě! Připipetovat 25 μl deionizované vody a promíchat.
- 3) 5 μl takto připraveného vzorku připipetovat ke 2 ml destilované vody v kyvetě z křemenného skla a měřit spektrofotometricky.
- 4) U předložených vzorků RNA změřit na spektrofotometru hodnoty absorbancí při vlnové délce 260 nm.
- 5) Podle výše uvedeného vzorce a pomocí naměřených hodnot vypočítat koncentraci RNA v předložených vzorcích.

Úkol č. 12: Měření čistoty RNA

Klíčová slova: spektrofotometr

Úvod: Při použití jakékoliv metody izolace RNA se nikdy nepodaří vyizolovat z buněk čistá ssRNA, ale vždy znečištěná dalšími komponentami jako jsou zejména proteiny a polysacharidy. Dalším nutným krokem je tedy její purifikace (vyčištění). Postupy purifikací RNA jsou většinou časově i finančně náročné, a proto je nezbytné nejdříve stanovit její čistotu. Nejrychlejší a nejschůdnější cestou je změření absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm, ze kterých je potom možné zjistit čistotu RNA.

Při měření čistoty RNA platí:

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) = 2,0$ čistá RNA

$A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm}) < 2,0$ znečištěná RNA (znečištění proteiny nebo aromatickými látkami)

Chemikálie a roztoky:

vzorky RNA

destilovaná voda

Pomůcky: kádinky, pipety, ústřížky buničité vaty, kyveta pro spektrofotometr z křemenného skla, parafilm

Přístroje: spektrofotometr

Postup:

- 1) U předložených vzorků RNA změřit na spektrofotometru hodnoty absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm.
- 2) Spočítat podíly $A(260) / A(280)$ pro jednotlivé vzorky a rozhodnout, jaká je jejich čistota.

Proteiny:

Proteiny jsou vysoce variabilní skupinou biologických makromolekul. Základními stavebními kameny jsou aminokyseliny, které se vážou do řetězce pomocí peptidické vazby. Pořadí jednotlivých aminokyselin v řetězci označujeme jako primární strukturu proteinů, ve které jsou zakódovány vlastnosti proteinů. Od primární struktury je odvozena sekundární (alfa-helix a beta-struktura skládaného listu), dále terciární (trojrozměrná struktura vyššího řádu - např. globulární) a následovně kvartérní struktura (sestavení funkčního proteinu z podjednotek).

Proteiny zabezpečují mnoho životně důležitých funkcí:

- mají význam při výstavbě organismů (strukturní proteiny)
- jsou nezbytné pro funkci imunitního systému (imunoglobuliny)
- účastní se metabolických pochodů (enzymy)
- regulují tělní funkce (hormony)
- regulují funkce genů (represory)
- účastní se transportu kyslíku krví do tkání (hemoglobin)
- udržují osmotické poměry buněk (albumin)
- jsou důležité při kontrakcích svalových vláken (aktin, myosin)
- regulují zásoby nezbytných prvků v organismu, např. Fe (ferritin)
- jsou významné pro membránový transport (proteinové kanálky)

Počátečním nezbytným krokem v laboratorní práci s konkrétními proteiny je samozřejmě jejich izolace, stanovení jejich koncentrace v roztoku, eventuálně určení jejich molekulových hmotností.

Pro kvantifikaci, porovnání a charakterizaci proteinů se používají zejména elektroforetické metody.

Úkol č. 13: Izolace frakce imunoglobulinů IgG z králičího krevního séra

Klíčová slova: imunoglobuliny

Úvod: Imunoglobuliny jsou proteiny zprostředkovávající humorální imunitu obratlovců a vyznačují se schopností vázat se na homologní determinanty antigenů. Jejich příprava je spojena s imunizací laboratorních zvířat jako jsou např. králík, myš. Moderní imunochemické metody (např. enzymová imunoanalýza) vyžadují izolovat imunoglobulinovou frakci IgG z krevního séra. K tomuto účelu se nejčastěji používá frakcionace síranem amonným a afinitní chromatografie. Princip chromatografie spočívá v rozdělení látek ve směsi na základě jejich různé rychlosti při jejich průchodu sloupcem pevné fáze. Tato rychlost závisí na různé interakci jednotlivých látek s pevnou fází, kdy proteiny procházejí přes kolonu Sephadex G-25 rychleji než síranové a amonné ionty.

Biologický materiál: králičí krevní sérum

Chemikálie a použité roztoky:

½ x PBS pufr (fyziologický roztok)

nasycený roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Sephadex G-25

zásobní roztok Bradfordové

Nesslerovo činidlo

Pomůcky: skleněné kyvety, skleněné pipety dělené 1 ml, 5 ml, 10 ml, pipetovací násadce, 10 ml odměrné válce, mikropipety, špičky, Erlenmayerovy baňky nebo kádinky (25 ml, 50 ml), zkumavky se stojanem, mikrozkušavky, popisovač

Přístroje: chlazená centrifuga (centrifugační kyvety 25 ml), laboratorní váhy (vyvážení kyvet před centrifugací), chromatografická kolona (Sephadex G-25) upevněná ve stojanu, vodní lázeň

Postup:

- 1) K 1 ml krevního séra v centrifugační kyvetě přidat 9 ml destilované vody a 10 ml nasyceného roztoku síranu amonného. Dobře promíchat a nechat 30 min. (60min.) stát při pokojové teplotě.
- 2) Centrifugovat 5 min. při 8 000 g při 4 °C.
- 3) Supernatant slít, sediment resuspendovat v 1 ml ½ PBS.
- 4) Nežádoucí amonné a síranové ionty odstranit odsolením na chromatografické koloně Sephadex G 25 kalibrované ½ PBS.
- 5) Na kalibrovanou kolonu nanést 1 ml resuspendovaného sedimentu a vymýt 20 ml ½ PBS (proteiny projdou kolonou rychleji, oddělí se od síranových a amonných iontů a převedou se do prostředí ½ PBS)
- 6) Sbírat 1 ml frakce do předem připravených zkumavek.
- 7) Orientačně pomocí reakce "Bradfordové" stanovit proteiny v jednotlivých frakcích.
- 8) Do zkumavek pipetovat po 1 ml pracovního roztoku Bradfordové, do první přidáme 20 µl ½ PBS, tj. nulový - srovnávací vzorek, do ostatních pipetovat po 20 µl jednotlivých frakcí a srovnávat zabarvení s nulovým vzorkem. (Vyvíjející se modré zbarvení reakční směsi je důkazem přítomnosti proteinů.)
- 9) Pomocí Nesslerova činidla kontrolovat přítomnost amonných iontů v jednotlivých frakcích.

- 10) Na destičku pipetovat 20 μ l jednotlivých frakcí, přidat 20 μ l Nesslerova činidla (žlutooranžové zabarvení naznačuje přítomnost amonných iontů).
- 11) Při zjištění přítomnosti amonných iontů odebrání frakcí ukončit.
- 12) Určit vzorek s nejvyšší koncentrací proteinů podle největší intenzity modrého zbarvení frakce vlivem činidla Bradfordové.
- 13) Z této frakce odebrat 40 μ l do mikrozkušavky typu Eppendorf, přidat 20 μ l denaturačního pufru Moreno a nechat působit 5 min. ve vroucí lázni.
- 14) Denaturované vzorky centrifugovat 5 min. při 7 000 g a zamrazit při -20°C .

Úkol č. 14: Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Klíčová slova: proteiny, spektrofotometr, metoda Bradfordové

Úvod: Zjištění koncentrace proteinů metodou Bradfordové je rychlým kolorimetrickým stanovením proteinů. Výhodou této metody je rychlé stanovení koncentrace proteinů v neznámém vzorku a citlivost reakce, protože umožňuje měřit koncentraci proteinů v rozmezí 25 µg/ml až 200 µg/ml. Nevýhodou metody je rozdílná citlivost různých proteinů k činidlu Bradfordové a skutečnost, že proteiny použité pro měření jsou ireverzibilně denaturované.

Podstata metody spočívá v reakci barviva (roztok činidla Bradfordové) a proteinů v prostředí kyseliny fosforečné za současné změny zbarvení roztoku. Měření absorbance se provádí při 595 nm proti blanku. Kalibrační křivka vykazuje vysokou linearitu v rozsahu hodnot absorbance 0,2 až 0,8 (1 cm kyveta). V tomto rozsahu absorbancí je zbarvení roztoku přímo úměrné koncentraci bílkoviny, proto je možné koncentraci vypočítat podle absorbance zařazených standardních vzorků. Jako standard se obvykle používá hovězí sérum albumin (BSA, bovine serum albumin) nebo vaječný albumin (OVA, ovalbumin).

Chemikálie a roztoky:

vzorky proteinů
destilovaná voda
pracovní roztok činidla Bradfordové
ethanol na omývání

Pomůcky: kádinky, pipety, ústřížky buničité vaty, ochranné gumové rukavice, skleněná kyveta pro spektrofotometr

Přístroje: spektrofotometr

Postup:

- 1) Do zkumavek napipetovat po 1,8 ml pracovního roztoku činidla Bradfordové. Přidat 200 µl vzorku (pokud je ho menší objem doplnit do 200 µl destilovanou vodou, příklad: 30 µl vzorku a 170 µl destilované vody), roztok dobře promíchat a nechat stát 5 min.
- 2) Napipetovat kontrolní vzorek (blank): 1,8 ml pracovního roztoku činidla Bradfordové a 200 µl destilované vody.
- 3) Změřit na spektrofotometru při 595 nm hodnotu absorbance všech vzorků a standardu.
- 4) Vypočítat koncentrace neznámých vzorků.

Poznámky:

- 1) Pozor! Činidlo Bradfordové je žiravina, protože obsahuje ve značné koncentraci kyselinu fosforečnou.
- 2) Při potřísnění kůže činidlem Bradfordové dojde k jejímu zmodrání, které se nedá umýt!
- 3) Činidlo Bradfordové způsobuje modré skvrny i při potřísnění oděvu, které díky značnému obsahu kyseliny po vyprání oděvu vypadnou.
- 4) Barevná reakce se měří po 5, maximálně 60 min. Po této době dochází k postupnému vysrážení komplexu protein – barvivo.

Úkol č. 15: Stanovení molekulových hmotností proteinů pomocí polyakrylamidové elektroforézy v denaturujících podmínkách

Klíčová slova: proteiny, polyakrylamidová elektroforéza

Úvod: Elektroforetické metody se používají na separaci látek (např. proteinů nebo nukleových kyselin), buněk nebo jiných částic nesoucích elektrický náboj. Pohyblivost molekul závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí a síle elektrického pole. Pro dělení proteinů se nejčastěji používá polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE).

Elektroforetická metoda SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát - polyakrylamidová gelová elektroforéza) je levná, reprodukovatelná a rychlá pro kvantifikaci, porovnání a charakterizaci proteinů. Tato metoda separuje proteiny především na základě jejich molekulové váhy. SDS se váže na protein tak, že SDS-proteinový komplex zaujímá velikost odpovídající molekulové váze. Rozlišení proteinů lze zpřesnit tím způsobem, že se dělení provádí v gradientu polyakrylamidového gelu (ve směru pohybu se zvyšuje koncentrace akrylamidu a tím se zmenšuje velikost pórů). Tuto metodu lze spolehlivě využít např. k separaci proteinů a k určení jejich molekulových hmotností.

Biologický materiál: vzorky proteinů izolované z králíčího séra, standardy molekulových hmotností (Serva Mix): phosphorylase B (92 500), bovine serum albumin (67 000), albumin egg (45 000), carbonic anhydrase (29 000)

Pomůcky: mikrozkuhavky, 50 ml kádinky, 10 ml pipety, 10 ml odměrné válce, 10 a 20 ml injekční stříkačky, mikropipety, špičky

Přístroje: vertikální ELFO komora, zdroj stejnosměrného proudu, vodní lázeň 100 °C, centrifuga (s rotorem pro mikrozkuhavky), vibrační třepačka

Chemikálie a použité roztoky:

akrylamid (acrylamide for electrophoresis)
bis-akrylamid (N,N'-metylenebisacrylamide)
TRIS (Tris(2-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-propandiol))
SDS (sodium dodecyl sulphate),
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylen-ethylenediamin)
peroxodisíran amonný
merkptoethanol (2-merkptoethanol)
glycerol
Na₂SO₃
vzorkový pufr MORENO 3x
glycin
HCl
barvivo BLUE R-250 (Serva)
methanol
ledová kyselina octová

Postup:

1) Připravit vzorky proteinů:

Smíchat 40 μ l roztoku proteinů (cca 1 mg/ml) s 20 μ l vzorkového pufru Moreno a 3 až 5 min. inkubovat při 100 °C ve vodní lázni. (Vzorky připravovat v mikrozkušavkách typu Eppendorf, u kterých se víčko předem propíchne špendlíkem.) Denaturovaný vzorek centrifugovat 5 min. při 7 000 g. Vzorky se potom ihned nanášejí na gel nebo se zamrazí při -20°C. Vždy po rozmrazení vzorků před jejich nanesením na gel opakovat centrifugaci.

2) Připravit polyakrylamidový gel:

a) Zvolit potřebnou koncentraci dělicího gelu a podle Tabulky I. v daném pořadí smíchat roztoky 1 až 5. Zkontrolovat předem složenou ELFO komoru, přidat složky 6 a 7, promíchat a ihned pomocí Pasteurovy pipety nanášet dělicí gel do ELFO komůrky. Po nanesení adekvátního množství opatrně převrstvit gel cca 0,5 až 1 cm vrstvou destilované vody (lépe izopropanolu). Gel nechat zpolymerizovat (asi 60 až 90 min.). Během této doby s kyvetou pro nanášení gelu nepohybovat. Po zpolymerizování gelu opatrně odsát vrstvu destilované vody a stejným způsobem na již zpolymerizovaný dělicí gel nanést gel zaostřovací (1,5 cm) až po hranu kyvety. Ihned zasunout cca 0,5 až 1 cm hluboko hřebínek pro tvorbu vzorkových jamek. Po zpolymerizování (minimálně 30 min.) zaostřovacího gelu opatrně hřebínek vytáhnout tak, aby se nenarušily vytvořené jamky. (Předem je nutné na sklo kyvety zakreslit dna jamek).

b) Do dolní a horní komory ELFO komůrky nalít elektrodový pufr tak, aby nevznikly na koncích gelu bubliny. Na dno jednotlivých jamek nanést kapilárou (popř. mikropipetou) po 10 μ l z připravených vzorků (síla gelu asi 1mm). Komoru vložit do chlazeného prostředí (např. chladnička), nastavit parametry ELFO zdroje stabilizovaného proudu (1 gel: 1 mm x 8 cm x 10 cm, 10 mA, 100 V, 1 W, 2 gely: 20 mA, 150 V, 3W). Připojit komoru tak, aby "-" pól byl na startu a "+" pól byl připojen k cíli elektroforézy, potom zdroj zapnout. Sledovat zónu bromfenolové modři, která je obsažena ve vzorcích a pohybuje se v čele dělených proteinů. Ve chvíli, kdy je tato modrá zóna cca 0,5 cm od konce gelu, vypnout zdroj a odpojit komoru.

c) Opatrně sundat skleněnou kyvetu a např. špičkou nože obalenou izolepou oddělit od sebe skla. Orientovat gel podle nanesených vzorků (jamka č. 1 - vlevo nahoře) a odříznout kousek spodního levého rohu. Gel přenést do barvicího roztoku a barvit za stálého míchání při pokojové teplotě přes noc. Potom gel odbarvovat při pokojové teplotě asi 24 hod. v odbarvovači až zůstanou výrazně zbarveny pouze proteinové zóny.

3) Na gelu vyhodnotit jednotlivé proteinové zóny. Uvést počet jednoznačně odlišených proteinů a určit jejich relativní molekulové hmotnosti srovnáním se standardy o známých relativních molekulových hmotnostech pomocí počítačového programu PhotoCaptMw.

III. Příprava použitých roztoků:

GET pufr

50mM glukóza 9,9 g
10mM EDTA 20 ml 0,5M
25mM TRIS-HCl, pH8 25,0 ml
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

lyzační roztok (alkalický roztok SDS)

0,2M NaOH 50 ml 4M
1% SDS 100 ml 10%
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

neutralizační roztok

3M octan draselný 600 ml 5M
5M ledová kyselina octová 115 ml
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml .

TE pufr (pH 8,0)

10mM Tris-HCl 10 ml 1M
1mM EDTA 2 ml 0,5M
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

0,5M EDTA 186,1 g
chelaton II dihydrát, pH upravovat pevným NaOH
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

7,5M octan amonný 578 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

3M octan sodný 204,1 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

5M NaCl 292,2 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

4M NaOH 160 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

1M TRIS-HCl (pH 8,0) 121,1 g
Rozpustit v menším objemu, pH upravovat koncentrovanou HCl.
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

2x LETS pufr

200 mM LiCl 8,48 g
500 mM EDTA 40 ml
20 mM Tris pH 7,8 2,42 g
2% SDS 20 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

10% SDS 100 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

0,2M LiCl 8,5 g
Doplnit destil. H₂O na 1 000 ml.

chloroform + izoamylalkohol (24:1)
96 ml chloroformu
4 ml izoamylalkoholu

SOB medium
2% kaseinový hydrolyzát 20 g
0,5% kvasničný autolyzát 5 g
10 mM KCl 10 ml 1M
1,6% agar 16 g
6.6-7 pH
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.
Autoklávovat 30 min. a do chladnoucího přidat sterilní Mg²⁺ (10 ml 1M MgCl₂, 10 ml 1M MgSO₄ – 10mM).

1M MgCl₂.6H₂O 203,3 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

1M MgSO₄ . 7H₂O 246,4 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

TFB pufr
100 mM KCl 7,4 g
45 mM MnCl₂.4H₂O 8,9 g
20 mM CaCl₂ 2,2 g
3 mM [Co(NH₄)₆]Cl₃ 0,8 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

DMSO+DTT (pH 7,5)
1 M DTT (dithiotreitol) 1,53 g
90% DMSO (dimethylsulfoxid) 9 ml
1 mM KAc (octan draselný) 100 µl 1M (pH 7,5)
Doplnit objem destil. H₂O na 10 ml.

LB medium (pH 7,2-7,4)
kaseinový hydrolyzát 10 g
kvasničný autolyzát 5 g
pepton 5 g
NaCl 10 g
Doplnit destil. H₂O do 1 000 ml.
Autoklávovat.

1M NaCl
NaCl 58,44 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

lyzační pufr

1M Tris-HCl (pH 7,8)	10 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	10 ml
5M NaCl	10 ml
20 % SDS zásob. roztoku	0,5 ml

Po rozpuštění doplnit objem destil. vodou na 100 ml.

Těsně před použitím přidat 40 µl 2-merkaptoetanolu na 10 ml tohoto pufru.

5M octan draselný

octan draselný 490,75 g
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

TE pufr (pH 8)

1 M Tris/HCl (pH 8,0)	10 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	2 ml

Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

Queen's lyzační pufr (pH 7,5)

TRIS	1,21 g
NaCl	0,58 g
Na ₂ EDTA + 2H ₂ O	3,72 g
n-lauroylsarcosin	10,00 g

Rozpustit v 900 ml destilované vody, upravit pH na hodnotu 7,5.
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

10% laurylsíran sodný (SDS)

SDS 10,0 g SDS
Rozpustit v 90 ml H₂O za mírného zahřátí.
Po rozpuštění doplnit objem destil. vodou na 100 ml.

3M octan sodný (pH 5,2)

NaCH₃COO + 3H₂O 408,24 g
Rozpustit v 800 ml destilované vody, upravit pH ledovou kyselinou octovou na hodnotu 5,2.
Doplnit objem destil. vodou na 1 000 ml.

TNE pufr (pH 7,4)

TRIS	1,211 g
Na ₂ EDTA + 2H ₂ O	0,372 g
NaCl	11,689 g

Rozpustit v 900 ml destilované vody, upravit pH koncentrovanou HCl na hodnotu 7,4.
Doplnit objem destil. vodou na 1 000 ml.

zásobní roztok barviva Hoechst 33258

barvivo H 33258 10 mg
Rozpustit v 10 ml destil. H₂O.
Uchovávat v láhvi z hnědého skla při 4 °C.

50 x TAE pufr

TRIS 242 g
rozpustit v 500 ml destilované H₂O
0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) 100 ml
ledová kyselina octová 57,1 ml
Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.
Před použitím 50 x zředit.

10 x nanášecí pufr pro agarózové gely

250 mg bromfenolové modři rozpustit v 33 ml 150 mM TRIS (pH 7,6)
Přidat 60 ml glycerolu a 7 ml destilované H₂O.
Uchovávat při 4 °C.

ethidium bromid – zásobní roztok

10 mg/ml v destilované vodě

zásobní roztok činidla Bradfordové

95% ethanol 100 ml
88% kyselina fosforečná 200 ml
Serva Blue G 350 mg

Přefiltrovat přes filtrační papír Whatman No. 1. Uchovávat v hnědé láhvi při pokojové teplotě. Roztok je takto uchován stabilní asi 1 měsíc. Při částečném vysrážení barviva opakovat filtrování.

pracovní roztok činidla Bradfordové

425 ml destilované H₂O
15 ml 95% ethanolu
30 ml 88% kyseliny fosforečné
30 ml zásobního roztoku činidla Bradfordové

PBS pufr

KH₂PO₄ 0,2 g
Na₂HPO₄.12H₂O 2,9 g
NaCl 8,0 g
KCl 0,2 g

Rozpustit v 800 ml destil. H₂O, pH upravit pomocí 0,1M HCl nebo 0,1M NaOH na hodnotu 7,2.

Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

Při skladování pufru déle než 5 dnů přidat do něj 0,2 g azidu sodného.

Příprava gelů pro SDS-polyakrylamidovou elektroforézu:

DĚLICÍ GEL:							
Zásobní roztok				Koncentrace dělicího gelu [%]			
Ac[g]	Bis[g]	Vol[ml]	T %	7,50	10	12	
Akrylamid	22,20	0,60	100	22,80	4,28	5,70	6,84 ml
Gel pufr (1.5M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8)				3,25	3,25	3,25	ml
H ₂ O				5,45	4,02	2,88	ml
TEMED*)				0,007	0,007	0,007	ml
Na ₂ SO ₃ [mg]				19,500	19,500	19,500	mg
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (100 mg/ml)				0,020	0,020	0,020	ml__

Celkový objem 13 ml stačí na cca 130 cm² 1 mm silného gelu.

*) pro PAGE gely % < 8% dávat dvojnásobek množství TEMED.

ZAOSTŘOVACÍ GEL:						
Zásobní roztok					Koncentrace dělicího gelu [%]	
Ac[g]	Bis[g]	Vol[ml]	T %	5%		
Akrylamid	22,20	0,60	100	22,80	2,19 ml	
Gel pufr (0.5M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8)					2,50 ml	
H ₂ O					5,28 ml	
TEMED					0,010 ml	
Na ₂ SO ₃ [mg]					15 mg	
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (100 mg/ml)					0,015 ml	

Celkový objem 10 ml stačí na cca 100 cm² 1 mm silného gelu.

elektrodový pufr s SDS (pH 8,3)

TRIS 3,0 g

glycin 1 4,4 g

SDS 1,0 g

Doplnit objem destil. H₂O na 1 000 ml.

vzorkový pufr MORENO 3x

0,5 M TRIS (pH 6,8) 17,5 ml

SDS 2,0 g

2-merkaptoethanol 5,0 ml

glycerol 10,0 ml

1% bromfenolová modř v destil. vodě 3,0 ml

Uchovávat při -20 °C.

barvicí roztok BLUE R-250 (Serva)

Serva BLUE R-250	1 g
methanol	450 ml
destil. voda	450 ml
ledová kyselina octová	1 000 ml

Serva BLUE R-250 rozpustit v methanolu a postupně přidávat zbývající složky roztoku.

odbarvovač BLUE R-250 (Serva)

methanol	100 ml
ledová kyselina octová	100 ml
destil. voda	800 ml

IV. Doporučená literatura:

Anonymous (1982): Isoelectric Focusing: principles & methods. Pharmacia Fine Chemical, Uppsala.

Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. *et* Struhl, K. (Eds.) (1998): Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.

Bollag, D.M.*et* Edelstein, S.J. (1991): Protein methods. Wiley-Liss, New York.

Dellaporta *et al.* (1983): Plant Mol. Biol. Reporter 4, 19.

Ondřej, M. *et* Drobník, J. (2002): Transgenoze rostlin, Academia, Praha.

Raclavský, V. (1998): Úvod do základních metod molekulární genetiky, Vydavatelství UP Olomouc.

Reim, P. (Ed.): Roche molecular biochemicals Lab FAQs – find a quick solution. Roche, Mannheim, ISBN 3-88630-245-8.

Sambrook, J., Fritsch, E.J. *et* Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

V. Příloha:

Zkratky:

dsDNA	(z angl. double-stranded)	– dvouvláknová DNA
ssDNA	(z angl. single-stranded)	– jednovláknová DNA
bp	(z angl. basepair)	– pár bází
kb	(z angl. kilobase)	– kilobaze = 1 000 bází nebo párů bází
Mb	(z angl. megabase)	– megabaze = 1 000 000 bp
Da	Dalton	– jednotka molekulové hmotnosti ($1\text{Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ g}$)

Metrické předpony:

G = giga	=	10^9
M = mega	=	10^6
k = kilo	=	10^3
m = mili	=	10^{-3}
μ = mikro	=	10^{-6}
n = nano	=	10^{-9}
p = pico	=	10^{-12}

Převody váhových jednotek:

1 μg	=	10^{-6} g
1 ng	=	10^{-9} g
1 pg	=	10^{-12} g