



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Izolace genomové DNA z krve

Jestliže v jednom mililitru lidské krve je obsaženo přibližně 4 až 10 milionů leukocytů, kolik μg DNA je možno maximálně izolovat z 200 μl plné krve? Přitom jeden leukocyt obsahuje DNA o celkové délce 2,9 miliardy nukleotidů, a že průměrná molekulová hmotnost jednoho nukleotidu je 325.

Řešení

1) Spočítáme, kolik leukocytů je obsaženo ve 200 μl krve

v 1 ml krve	je obsaženo	4 až 10×10^6 leukocytů
ve 200 μl krve	je obsaženo	X

$$X = 4 \text{ až } 10 \times 10^6 / 5 = 0,8 \text{ až } 2 \times 10^6 \text{ leukocytů}$$

Ve 200 μl krve je obsaženo 0,8 až 2×10^6 leukocytů

2) Spočítáme hmotnost DNA v jednom leukocytu

$6,023 \times 10^{23}$ nukleotidů	má hmotnost	325 g
$2,9 \times 10^9$ nukleotidů	má hmotnost	Y

$$Y = 2,9 \times 10^9 \times 325 / 6,023 \times 10^{23} = 1,6 \times 10^{-12} \text{ g} = 1,6 \text{ fg}$$

V jednom leukocytu je obsaženo přibližně 1,6 fg DNA

3) Spočítáme hmotnost DNA v celkovém množství leukocytů

v 1 leukocytu	je obsaženo	$1,6 \times 10^{-12}$ g DNA
v 0,8 až 2×10^6 leukocytech	je obsaženo	Z

$$Z = 0,8 \text{ až } 2 \times 10^6 \times 1,6 \times 10^{-12} = 1,28 \times 10^{-6} \text{ až } 3,2 \times 10^{-6} \text{ g} = 1,28 \text{ až } 3,2 \mu\text{g}$$

Odpověď:

Z 200 μl plné krve lze maximálně izolovat přibližně 1,28 až 3,2 μg DNA

Izolace genomové DNA z rostlinných buněk

Doplňte následující tabulku týkající se genomové DNA různých organismů

Organismus	Velikost DNA (bp)	Molární hmotnost	Hmotnost 1 molekuly	Počet molekul v 1 g
Člověk	$3,0 \times 10^9$			
<i>Drosophila</i>	$1,2 \times 10^8$			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,6 \times 10^7$			
<i>Escherichia coli</i>	$4,0 \times 10^6$			
Bakteriofág λ	48 514			
<i>Zea mays</i>	$3,9 \times 10^9$			

Poznámka

Molekulová hmotnost jednoho páru bazí M (1bp) = 650.

Řešení: (vzorový výpočet pro člověka)

1) Stanovíme molární hmotnost, tedy hmotnost jednoho molu molekul

$$= 650 \times 3,0 \times 10^9 = 1,95 \times 10^{12}$$

2) Spočítáme hmotnost jedné molekuly DNA

6,023 x 10 ²³ molekul	má hmotnost	1,95 x 10 ¹² g
1 molekula	má hmotnost	X g

$$X = 1,95 \times 10^{12} / 6,023 \times 10^{23} = 3,24 \times 10^{-12} \text{ g}$$

3) Stanovíme počet molekul v 1 g

6,023 x 10 ²³ molekul	má hmotnost	1,95 x 10 ¹² g
Y molekul	má hmotnost	1 g

$$X = 6,023 \times 10^{23} / 1,95 \times 10^{12} = 3,09 \times 10^{11} \text{ g}$$

Odpověď:

Organismus	Velikost DNA (bp)	Molární hmotnost	Hmotnost 1 molekuly	Počet molekul v 1 g
Člověk	$3,0 \times 10^9$	$1,95 \times 10^{12}$	$3,24 \times 10^{-12} \text{ g}$	$3,09 \times 10^{11}$
<i>Drosophila</i>	$1,2 \times 10^8$	$7,80 \times 10^{10}$	$1,30 \times 10^{-13} \text{ g}$	$7,72 \times 10^{12}$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,6 \times 10^7$	$1,04 \times 10^{10}$	$1,73 \times 10^{-14} \text{ g}$	$5,79 \times 10^{13}$
<i>Escherichia coli</i>	$4,0 \times 10^6$	$2,60 \times 10^9$	$4,32 \times 10^{-15} \text{ g}$	$2,32 \times 10^{14}$
Bakteriofág λ	48 514	$3,15 \times 10^7$	$5,23 \times 10^{-17} \text{ g}$	$1,91 \times 10^{16}$
<i>Zea mays</i>	$3,9 \times 10^9$	$2,54 \times 10^{12}$	$4,22 \times 10^{-12} \text{ g}$	$2,37 \times 10^{11}$

Izolace plasmidové DNA

1) Jak se můžete přesvědčit o tom, která z forem plasmidu pozorovaná na vašem izolátu po elektroforéze je L-forma?

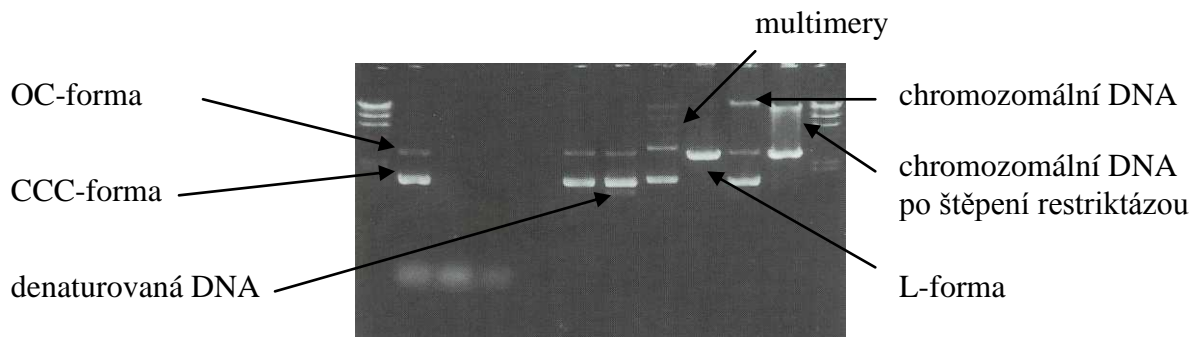
Odpověď:

Rozštěpením plasmidové DNA restriční endonukleázou, která štěpí plasmid jen 1x. Všechny formy se přemění formu lineární.

2) Na uvedeném elektroforetickém snímku vyznačte různé formy plasmidu.



Odpověď:



3) Co lze říci o průběhu izolace plasmidové DNA, jestliže je na elektroforetickém gelu vidět pruh denaturované DNA ?

Odpověď:

Že lyze buněk probíhala příliš dlouho nebo za vysokého pH (vyššího než 12,45)

Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

- 1) Určete koncentraci roztoku DNA u něhož byla hodnota absorbance při 260 nm po 10 násobném zředění rovna 0,15?

Řešení:

Jestliže je absorbance $A_{260} = 1,0$, pak má roztok DNA koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$

$M(1 \text{ bp}) = 650$

1) Určíme koncentraci plasmidové DNA v roztoku

jestliže je $A_{260} = 1,0$	pak koncentrace je	50 $\mu\text{g/ml}$
jestliže je $A_{260} = 10 \times 0,15$	pak koncentrace je	X $\mu\text{g/ml}$

$$X = 10 \times 0,15 \times 50 = 75 \mu\text{g/ml}$$

- 2) Kolikrát musíte naředit roztok DNA o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, aby byla jeho absorbance při 260 nm rovna hodnotě 0,2?

Řešení:

Jestliže je absorbance $A_{260} = 1,0$, pak má roztok DNA koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$

koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$	pak absorbance A_{260}	1,0
koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$	pak absorbance A_{260}	2,0

$$2,0/0,2 = 10$$

Odpověď:

Roztok DNA musíme naředit 10x

Poznámka:

Protože závislost absorbance na koncentraci DNA není lineární, je toto číslo jen odhadem

Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

- 3) Koncentraci RNA lze podobně jako koncentraci DNA stanovit spektrofotometricky. Platí převodní vztah, že ssRNA má koncentraci 40 μ g/ml, jestliže OD₂₆₀ v 1cm kyvetě je rovna 1,0. Přepočtete tento údaj na molaritu.

Řešení:

M (1 nukleotidu v RNA) = 360

1) Stanovíme počet nukleotidů v 1 ml takového roztoku

6,023 x 10 ²³ nukleotidů v RNA	má hmotnost	360 g
X nukleotidů	má hmotnost	40 x 10 ⁻⁹ g

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 40 \times 10^{-9} / 360 = 6,7 \times 10^{13} \text{ nukleotidů}$$

2) Stanovíme molaritu

1 litr 1M roztoku	obsahuje	6,023 x 10 ²³ nukleotidů
1 ml 1M roztoku	obsahuje	6,023 x 10 ²⁰ nukleotidů
1 ml Y M roztoku	obsahuje	6,7 x 10 ¹³ nukleotidů

$$Y = 6,7 \times 10^{13} / 6,023 \times 10^{20} = 1,11 \times 10^{-7} \text{ M} = 0,11 \times 10^{-6} \text{ M} = 0,11 \text{ mM}$$

Odpověď:

Roztok je 0,11 mM

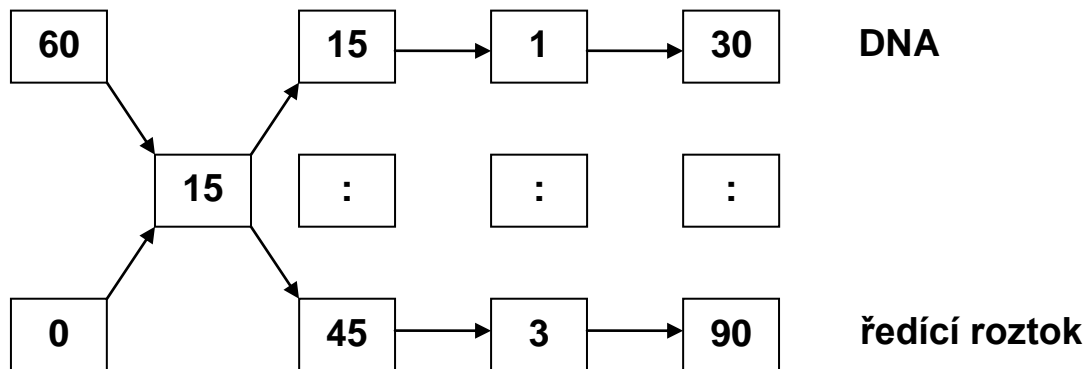
Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

- 3) Kolik ředícího roztoku přidáte do 30 μl vzorku DNA o koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$ tak, aby koncentrace DNA po zředění klesla na 15 $\text{ng}/\mu\text{l}$?

Řešení:

$$60 \mu\text{g/ml} = 60 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Použijeme směšovacího pravidla



Odpověď:

Do vzorku DNA přidáme 90 μl ředícího roztoku

Restrikční štěpení plasmidové DNA

1) Jaké množství plasmidu (v μl) přidáte do reakční směsi, potřebujete-li štěpit 500 ng plasmidu a je-li jeho zásobní koncentrace 100 ng/ μl ?

Řešení:

1 μl zásobní koncentrace	obsahuje	100 ng plasmidu
X μl zásobní koncentrace	obsahuje	500 ng plasmidu

$$X = 500/100 = 5 \mu\text{l}$$

Odpověď:

Do reakční směsi přidáme 5 μl plasmidu

2) Jedna jednotka restrikční endonukleázy (značí se u) je množství enzymu, které rozštěpí 1 μg DNA fága λ za optimálních reakčních podmínek při 37°C za 1 hodinu. Na molekule DNA fága λ je celkem 6 štěpných míst pro restriktaezu *Hinf*I. Jaké množství plasmidu pUC18 rozštěpí 1 jednotka restriktaezu *Hinf*I za jednu hodinu, jestliže je na tomto plasmidu jen jedno restrikční místo ? Velikost plasmidu pUC18 je 2 686 bp.

Řešení:

Velikost DNA fága λ = 48 502 bp

1) Spočítáme počet molekul fága λ , které enzym *Hinf*I rozštěpí

6,023 x 10 ²³ molekul	má hmotnost	650 x 48 502 g
X molekul	má hmotnost	1 x 10 ⁻⁶ g

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 1 \times 10^{-6} / 650 \times 48\,502 = 1,91 \times 10^{10} \text{ molekul}$$

2) Molekul plasmidu, které enzym *Hinf*I rozštěpí je 6x více

$$6 \times 1,91 \times 10^{10} = 11,46 \times 10^{10} \text{ molekul}$$

3) Spočítáme hmotnost 11,28 x 10¹⁰ molekul plasmidu pUC18

6,023 x 10 ²³ molekul	má hmotnost	650 x 2 686 g
11,46 x 10 ¹⁰ molekul	má hmotnost	Y

$$Y = 11,46 \times 10^{10} \times 650 \times 2\,686 / 6,023 \times 10^{23} = 3,32 \times 10^{-7} \text{ g} = 0,332 \times 10^{-6} \text{ g} = 332 \text{ ng}$$

Odpověď:

Jedna jednotka *Hinf*I rozštěpí za daných podmínek 332 ng plasmidu

Restrikční štěpení plasmidové DNA

3) Jak dlouho bude štěpit 1u restrikční endonukleázy *Hind* III 200 ng plasmidu pUC18 ? Na tomto plasmidu je jediné restrikční místo pro restriktázu *Hind* III.

Řešení:

Vydeme z výsledků předchozího příkladu

Podmínky štěpení *Hind* III jsou stejné jako v případě *Hinf* I

1 u <i>Hind</i> III rozštěpí	332 ng plasmidu	za 60 minut
1 u <i>Hind</i> III rozštěpí	200 ng plasmidu	za X minut

$$X = 200 \times 60 / 332 = 36$$

Odpověď:

Restriktáza *Hind* III bude štěpit plasmid 36 minut

Ostatní enzymy

- 1) Jedna jednotka zpětné transkriptázy z Moloney Murine Leukemia Viru (M-MuLV) inkorporuje 1nmol dTTP do struktury DNA na RNA matrici za 10 minut při 37°C. Za předpokladu, že podobnou rychlostí inkorporuje ostatní deoxyribonukleotidy stanovte rychlost v nukleotidech za sekundu.

Řešení:

- 1) Stanovíme množství inkorporovaných nukleotidů

1 mol	je	$6,023 \times 10^{23}$ nukleotidů
1 nmol	je	X nukleotidů
X ribonukleotidů	má M	108 000

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 1 \times 10^{-9} = 6,023 \times 10^{14} \text{ nukleotidů}$$

- 2) Vypočteme rychlost inkorporace

za 10 minut	je začleněno	$6,023 \times 10^{14}$ nukleotidů
za 1 sekundu	je začleněno	Y nukleotidů

$$Y = 6,023 \times 10^{14} / 10 \times 60 = 1 \times 10^{12} \text{ nukleotidů/s}$$

Odpověď:

Rychlost začleňování je 1×10^{12} deoxyribonukleotidů/sekundu

- 2) Uvažujte rychlost syntézy DNA zpětnou transkriptázou podle zadání v předchozí úloze č. 12/1. Kolik μl zpětné transkriptázy ze zásobního roztoku o koncentraci 20 000 u/ml použijete k přípravě molekul DNA o průměrné délce 500 nukleotidů tak, aby teoretický výtěžek při 10% účinnosti syntézy činil 500 ng DNA?

Řešení:

Rychlost začleňování je (podle zadání úlohy č. 12/1) 1×10^{12} deoxyribonukleotidů/sekundu jednou jednotkou zpětné transkriptázy

- 1) Spočítáme, kolik nukleotidů musí být nasyntetizováno jednou jednotkou při 100% účinnosti

$6,023 \times 10^{23}$ nukleotidů	má hmotnost	325 g
X nukleotidů	má hmotnost	500×10^{-9} g

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 500 \times 10^{-9} / 325 \text{ g} = 9,27 \times 10^{14} \text{ nukleotidů}$$

Ostatní enzymy

2) Při 10% účinnosti je to

$$9,27 \times 10^{13} \text{ nukleotidů}$$

3) Spočítáme kolik jednotek zpětné transkriptázy je zapotřebí

1 jednotka	syntetizuje	1×10^{12} deoxyribonukleotidů
Y jednotek	syntetizuje	$9,27 \times 10^{13}$ deoxyribonukleotidů

$$Y = 9,27 \times 10^{13} / 10^{12} = 92,7 \text{ jednotky}$$

4) Spočítáme objem zpětné transkriptázy

1 000 μl	obsahuje	20 000 u
Z μl	obsahuje	92,7 u

$$Z = 92,7 \times 1\,000 / 20\,000 = 4,6 \mu\text{l}$$

Odpověď:

Použijeme asi 4,6 μl zpětné transkriptázy a syntéza bude ukončena za 1 sekundu

3) Kolika jednotkám T4 DNA ligázy od firmy New England Biolabs odpovídá 1 Weissova jednotka ?

Řešení:

Jedna jednotka T4 DNA ligázy od firmy New England Biolabs je množství enzymu, které spojí 50% *Hind* III fragmentů DNA fága λ (koncentrace 5'-konců 0,12 μM , 300 $\mu\text{g/ml}$) ve reakci o objemu 20 μl za 30 minut při 16°C. Takto definovaná jedna jednotka je ekvivalentní 0,015 Weissovým jednotkám.

1 jednotka NEB	je	0,015 jednotek Weissových
X jednotek NEB	je	1 jednotka Weissova

$$X = 1/0,015 = 67 \text{ jednotek NEB}$$

Odpověď:

Jedna Weissova jednotka odpovídá 67 jednotkám T4 ligázy od firmy NEB

Polymerázová řetězová reakce

- 1) Limit detekce DNA na transluminátoru je přibližně 5ng. Kolik cyklů PCR musí proběhnout, aby bylo možno detekovat amplifikační produkt mutantní alely CCR5 Δ 32 o délce 130 bp, jestliže na počátku reakce máte ve směsi pouze jedinou kopii genu pro CCR5 Δ 32?

Řešení:

$$M(1 \text{ bp}) = 650$$

- 1) Spočítáme, kolik molekul amplikonu o délce 130 bp je obsaženo v 5ng

$$\begin{array}{rclclcl} 6,023 \times 10^{23} \text{ molekul} & \dots & \text{má hmotnost} & \dots & 650 \times 130 \text{ g} \\ X \text{ molekul} & \dots & \text{má hmotnost} & \dots & 5 \times 10^{-9} \text{ g} \end{array}$$

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 5 \times 10^{-9} / 650 \times 130 = 3,56 \times 10^{10} \text{ molekul}$$

- 2) Spočítáme, kolik molekul amplikonu vzniká v různých cyklech

Počet nově vzniklých molekul při amplifikaci lze vyjádřit vzorcem

$$A = (2^n - 2n)x$$

kde n = počet cyklů PCR reakce
 x = počet kopií původní matrice

Předpokládejme, že $X = 1$, tedy že na počátku byla v reakci jediná kopie alely

Cyklus č. (n)	Amplikony ($2^n - 2n$)x
20	10 485 438
30	$1,07 \times 10^9$
31	$2,15 \times 10^9$
32	$4,29 \times 10^9$
33	$8,59 \times 10^9$
34	$1,72 \times 10^{10}$
35	$3,44 \times 10^{10}$
36	$6,87 \times 10^{10}$
40	1.10×10^{12}

Odpověď:

Musí proběhnout alespoň 36 cyklů PCR

Polymerázová řetězová reakce

- 2) Jak dlouhý amplikon může vzniknout na níže popsaném úseku DNA (je uveden pouze jeden z komplementárních řetězců) pokud má experimentátor k dispozici následující dvojici primerů?

Primer forward:

5'- ATG TGA GCG GTC TAC TGG - 3'

Primer reverse:

5'- GAT AGC TAG AAT TGA TAG - 3'

Sekvence na které probíhá amplifikace:

5'- ATG TGA GCG GTC TAC TGG AAA TGC AGT GCA TCA GTC AGC GAT GGG
TGA GTC ACC CCC GTC ACG TCA GAT TCA TGA CTA AGC GTC CGT GCT
TGA TCG AGT CTA TCA ATT CTA GCT ATC ATC ATG GTT GAC ATC - 3'

Řešení:

- 1) Primer forward má stejnou sekvenci i orientaci jako zadaná sekvence
- 2) Primer reverse je třeba obrátit a vytvořit jeho komplementární sekvenci, je tedy třeba na zadané sekvenci hledat následující posloupnost:

5'- CTA TCA ATT CTA GCT ATC - 3'

Pozice primerů jsou vyznačeny podtržením

5'- ATG TGA GCG GTC TAC TGG AAA TGC AGT GCA TCA GTC AGC GAT GGG
TGA GTC ACC CCC GTC ACG TCA GAT TCA TGA CTA AGC GTC CGT GCT
TGA TCG AGT CTA TCA ATT CTA GCT ATC ATC ATG GTT GAC ATC - 3'

Vzdálenost mezi ATG a ATC je 117 bp

Odpověď:

Na popsaném úseku DNA může vzniknout amplikon o délce 117 bp

Polymerázová řetězová reakce II

1) *Taq* polymeráza připojuje nukleotidy rychlostí 150 nukleotidů/sekundu. Jak dlouho trvá tomuto enzymu, než nasyntetizuje fragmenty o délce 190 a 490 bp?

Řešení:

150 nukleotidů	je připojeno za	1 s
190 nukleotidů	je připojeno za	X s

$$X = 190/150 = 1,27 \text{ s}$$
$$X = 490/150 = 3,27 \text{ s}$$

Odpověď:

Fragmenty jsou teoreticky nasyntetizovány za 1,27 sekundy a 3,27 sekundy

2) Jedna jednotka enzymu *Taq* polymerázy inkorporuje 10nmol nukleotidů za 30 minut při teplotě 72°C. Přepočítejte tuto hodnotu na počet inkorporovaných nukleotidů za minutu.

Řešení:

$10 \times 10^{-9} \text{ mol}$	je připojeno za	30 min.
X mol	je připojeno za	1 minutu

$$X = 10 \times 10^{-9}/30 \text{ mol}$$

1 mol	je	$6,023 \times 10^{23}$ nukleotidů
$10 \times 10^{-9}/30 \text{ mol}$	je	Y nukleotidů

$$Y = (10 \times 10^{-9}/30) \times 6,023 \times 10^{23}/1 \text{ [mol} \times \text{nukleotidů/mol]}$$
$$= 2 \times 10^{14} \text{ nukleotidů} = 200 \times 10^{12} \text{ nukleotidů}$$

Odpověď:

Jedna jednotka enzymu *Taq* polymerázy inkorporuje přibližně 200×10^{12} nukleotidů za minutu

Polymerázová řetězová reakce II

3) Jestliže frekvence začlenění chybného nukleotidu činí u *Taq* polymerázy 285×10^{-6} , kolikrát může tento enzym chybovat při syntéze 200 ng amplikonu o délce 500 bp? Co můžete říct o počtu chybných amplikonů v takovém výsledném vzorku DNA?

Řešení:

M (1 bp) = 650

1) Spočítáme počet nukleotidů v daném množství amplikonů

$6,023 \times 10^{23}$ nukleotidů	má hmotnost	650 g
X nukleotidů	má hmotnost	200×10^{-9} g

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 200 \times 10^{-9} / 650 = 1,85 \times 10^{14} \text{ nukleotidů}$$

2) Stanovíme podíl chybně začleněných nukleotidů

$$1,85 \times 10^{14} \times 285 \times 10^{-6} = 5,27 \times 10^{10} \text{ nukleotidů}$$

3) Stanovíme podíl chybných amplikonů

$$5,27 \times 10^{10} / 500 = 1,05 \times 10^8 \text{ amplikonů} = 105 \times 10^6 \text{ amplikonů}$$

Odpověď:

Chybně bude začleněno $5,27 \times 10^{10}$ nukleotidů
105 milionů amplikonů bude chybných

Poznámka:

Ve skutečnost bude počet chybných amplikonů vyšší, protože chyba v prvních cyklech se přenesou i do dalších amplikonů.

4) Stanovte teplotu annealingu pro primery LEP2 a LEP530.

Řešení:

Pro výpočet teploty annealingu použijeme jednoduchou aproximaci

$$T_m = 4 \times (\text{obsah G+C}) + 2 \times (\text{obsah A + T})$$

V našem případě

$$\text{LEP2} = 5' - \text{CTT CTT GGG AAG GAA AAT GC} - 3' = (9 \times 4) + (11 \times 2) = 58^\circ\text{C}$$

Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu

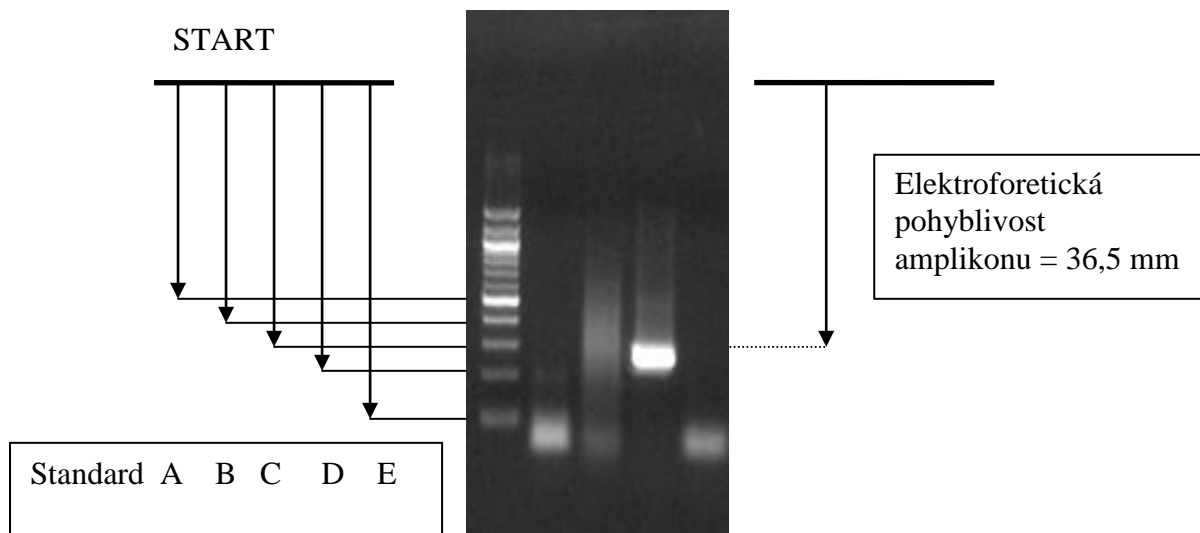
LEP530 = 5'- GTA GAC TTG CAG GAA GAG TG - 3' = $(10 \times 4) + (10 \times 2) = 60^\circ\text{C}$

Odpověď:

Teplota annealingu primeru LEP2 je 58°C a primeru LEP530 je 60°C

Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu

- 1) Závislost velikosti DNA na elektroforetické není lineární. V určitém zjednodušení může být vyjádřena logaritmickou funkcí. Stanovte délku amplifikačního produktu z obrázku výsledné elektroforézy.



Velikost standardů	Elektroforetická pohyblivost
A = 500bp	29,0 mm
B = 400bp	32,5 mm
C = 300bp	35,5 mm
D = 200bp	38,0 mm
E = 100bp	45,0 mm

Návod řešení:

Vyneste hodnoty přirozeného logaritmu velikosti standardů a elektroforetické pohyblivosti do grafu a z něho pak odečtěte velikost amplikonu.

$$N = \ln X$$

kde

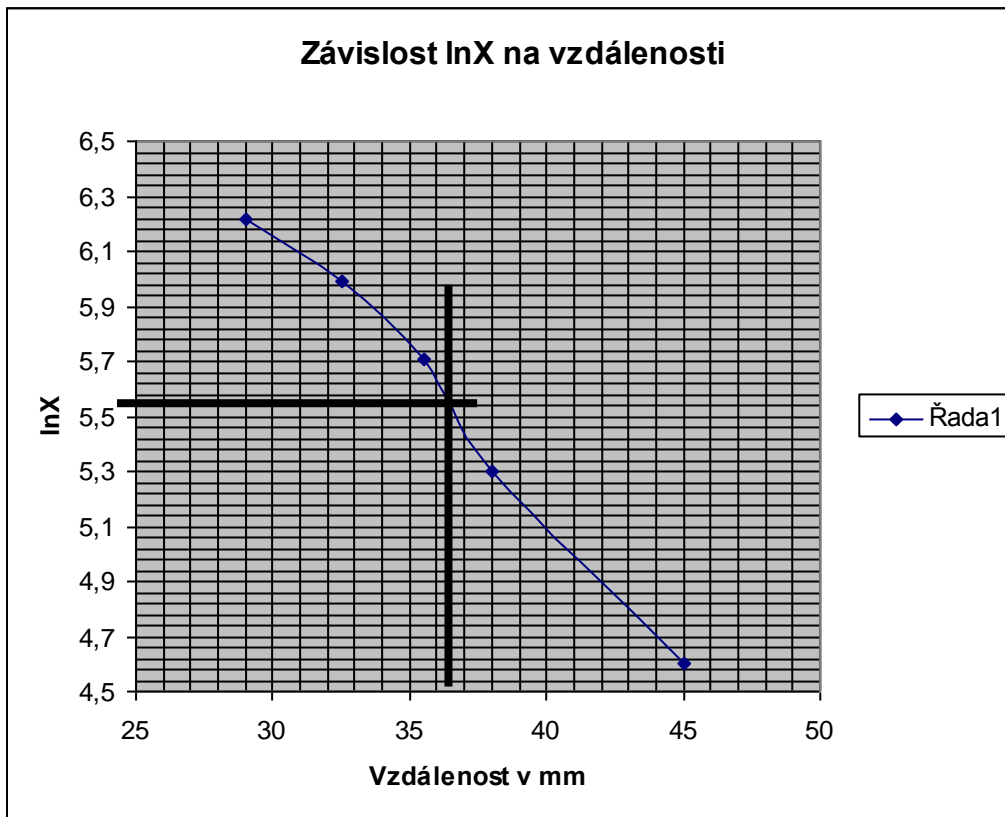
N = elektroforetická pohyblivost v cm

X = velikost DNA fragmentu v bp

Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu

Řešení:

1) Vytvoření grafu závislosti velikosti fragmentu na elektroforetické pohyblivosti



2) Vynesení hodnoty 36,5 mm

3) Odečtená hodnota $\ln X =$ asi 5,55

Odpověď:

Délka amplifikačního produktu je 257 bp

Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu

2) Jaká je výsledná koncentrace ethidiumbromidu ve Vámi připraveném agarózovém gelu?

Řešení:

Přidáváme roztok ethidium bromidu (0,15 mg/ml) tak, že množství přidaného objemu roztoku ethidiumbromidu v mikrolitrech musí být stejné jako objem gelu v mililitrech.

Řešme pro případ, že je náš objem gelu roven 100 ml

**Přidáme 100 μ l roztoku ethidiumbromid do 100 ml gelu
Roztok ethidiumbromid tedy ředíme 1 000x**

Zásobní roztok: 0,15 mg/ml = 150 μ g/ml

Zředěný roztok: 150 ng/ml

Odpověď:

Výsledná koncentrace ethidiumbromid v námi připraveném gelu je 150 ng/ml

Elektroforéza nukleových kyselin v agarózovém gelu

3) Kolik ml zásobního roztoku ethidiumbromidu (10mg/ml) použijete pro přípravu 100 ml roztoku o koncentraci 0,15 mg/ml?

Řešení:

1) *Spočítáme hmotnost ethidiumbromidu ve 100ml roztoku*

v 1 ml roztoku	je ethidiumbromidu	0,15 mg
ve 100 ml roztoku	je ethidiumbromidu	X mg

$$X = 0,15 \times 100 = 15 \text{ mg ethidiumbromidu}$$

2) *Stanovíme nezbytný objem zásobního roztoku*

v 1 ml zásobního roztoku	je ethidiumbromidu	10 mg
v Y ml zásobního roztoku	je ethidiumbromidu	15 mg

$$Y = 15/10 = 1,5 \text{ ml}$$

Odpověď:

Použijeme 1,5 ml zásobního roztoku

Centrifugace

- 1) Při jakých otáčkách budete centrifugovat bakteriální buňky, jestliže máte rotor o poloměru 10 cm a buňky sedimentují při 1 000g ?

Řešení:

$$\mathbf{RCF = 1,119 \times 10^{-5} \times rpm^2 \times r}$$

Z toho plyne, že

$$rpm = (RCF / 1,119 \times 10^{-5} \times r)^{1/2}$$

$$rpm = (1\,000 / 1,119 \times 10^{-5} \times 10)^{1/2}$$

$$rpm = 2\,989$$

- 2) Jakému přetížení budou vystaveny částice, které centrifugujete v rotoru o poloměru 15 cm, jestliže se rotor otáčí rychlostí 50 000 otáček za minutu?

Řešení:

$$\mathbf{RCF = 1,119 \times 10^{-5} \times rpm^2 \times r}$$

$$RCF = 1,119 \times 10^{-5} \times (50\,000)^2 \times 15$$

$$RCF = 419\,635g$$

Základní informace

Při výpočtech vycházíme z následujících informací o nukleových kyselinách a proteinech:

Počet částic v jednom molu = $6,023 \times 10^{23}$

Průměrná molekulová hmotnost páru bází v DNA = 650

Průměrná molekulová hmotnost bází v RNA = 360

Průměrná molekulová hmotnost aminokyseliny = 110

Pro dsDNA když $A_{260} = 1,0$ v 1cm kyvetě, pak koncentrace dsDNA = $50 \mu\text{g/ml} = 0,15\text{mM}$

Pro ssDNA když $A_{260} = 1,0$ v 1cm kyvetě, pak koncentrace ssDNA = $33 \mu\text{g/ml} = 0,10\text{mM}$

Pro ssRNA když $A_{260} = 1,0$ v 1cm kyvetě, pak koncentrace ssRNA = $40 \mu\text{g/ml} = 0,11\text{mM}$

Molekulová hmotnost dsDNA = (počet bp) x 650

Počet molů konců dsDNA = $2 \times (\text{hmotnost DNA v gramech}) / (\text{molekulová hmotnost})$

Počet molů konců vytvořených restrikčním štěpením

a) kružnicová DNA = $2 \times (\text{moly DNA}) \times (\text{počet štěpných míst})$

b) lineární DNA = $2 \times (\text{moly DNA}) \times (\text{počet štěpných míst}) + 2 \times (\text{moly DNA})$

$1 \mu\text{g}$ DNA o délce 1 000 bp = $1,5 \text{ pmol} = 9,1 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA plasmidu pUC18/19 (délka 2 686 bp) = $0,57 \text{ pmol} = 3,4 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA plasmidu pBR322 (délka 4 361 bp) = $0,35 \text{ pmol} = 2,1 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA fága M13mp18/19 (délka 7 249 bp) = $0,21 \text{ pmol} = 1,3 \times 10^{11}$ molekul

$1 \mu\text{g}$ DNA fága λ (délka 48 502 bp) = $0,03 \text{ pmol} = 1,8 \times 10^{10}$ molekul

1 pmol DNA o délce 1 000 bp = $0,66 \mu\text{g}$

1 pmol DNA plasmidu pUC18/19 (délka 2 686 bp) = $1,77 \mu\text{g}$

1 pmol DNA plasmidu pBR322 (délka 4 361 bp) = $2,88 \mu\text{g}$

1 pmol DNA fága M13mp18/19 (délka 7 249 bp) = $4,78 \mu\text{g}$

1 pmol DNA fága λ (délka 48 502 bp) = $32,01 \mu\text{g}$

DNA o délce 1,0 kb má kódovací kapacitu 333 aminokyselin = protein o $M = 37\ 000$

Protein o $M = 10\ 000$ může být kódován DNA o velikosti 270 bp

Protein o $M = 50\ 000$ může být kódován DNA o velikosti 1,55 kb