

## Nukleové kyseliny

Molekulová hmotnost jednoho nukleotidu je 325.

- Kolik molů obsahuje 1 μg DNA o délce 50 000 bp?
- Kolik je to molekul?
- Jakou hmotnost má 1 molekula takové DNA?

### Řešení

Molekulová hmotnost DNA o délce 50 000bp =  $2 \times 325 \times 50\,000 = 32,5 \times 10^6$

a)					
1mol uvedené DNA	.....	má hmotnost	.....	$32,5 \times 10^6$ g	
x molů	.....	má hmotnost	.....	$10^{-6}$ g	

---

$$X = 10^{-6} / 32,5 \times 10^6 = 31 \times 10^{-15} \text{ molu}$$

Jeden ug DNA o délce 50 000bp představuje  $31 \times 10^{-15}$  molu

b)					
1mol	.....	obsahuje	.....	$6,023 \times 10^{23}$ molekul	
$31 \times 10^{-15}$ molu	.....	obsahuje	.....	x molekul	

---

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 31 \times 10^{-15} = \text{asi } 19 \times 10^9 \text{ molekul}$$

### Odpověď:

Jeden ug DNA o délce 50 000bp obsahuje asi 19 miliard molekul

c)					
1mol	.....	$6,023 \times 10^{23}$ molekul	.....	má hmotnost	..... $32,5 \times 10^6$ g
		1 molekula	.....	má hmotnost	..... x g

---

$$X = 32,5 \times 10^6 / 6,023 \times 10^{23} = \text{asi } 5,4 \times 10^{-17} \text{ g} = 55 \times 10^{-18} \text{ g}$$

### Odpověď:

Jedna molekula DNA o délce 50 000bp má hmotnost asi 54 attogramů

**Kolik molekul obsahuje 1µg DNA o velikosti**

- 40 000 bp
- 50 000 bp
- 400 000 bp

Řešení

$6,023 \times 10^{23}$ molekul	.....	má hmotnost	.....	$2 \times 330 \times$ velikost v bp (g)
x molekul	.....	má hmotnost	.....	$10^{-6}$ g

---

pro 40 000bp  $X = 6,023 \times 10^{23} \times 10^{-6} / 2 \times 330 \times 40\ 000 = 22,8 \times 10^9$  molekul

pro 50 000bp  $X = 6,023 \times 10^{23} \times 10^{-6} / 2 \times 330 \times 50\ 000 = 18,2 \times 10^9$  molekul

pro 400 000bp  $X = 6,023 \times 10^{23} \times 10^{-6} / 2 \times 330 \times 400\ 000 = 22,8 \times 10^8$  molekul

Odpověď:

**Jeden ug DNA o délce 40 000bp obsahuje  $22,8 \times 10^9$  molekul**

**Jeden ug DNA o délce 50 000bp obsahuje  $18,2 \times 10^9$  molekul**

**Jeden ug DNA o délce 400 000bp obsahuje  $22,8 \times 10^8$  molekul**

Poznámka:

**!!!! Čím větší molekula, tím menší počet molekul na jednotku hmotnosti!!!!**

Doplňte následující tabulku:

Organismus	Velikost DNA (bp)	Molární hmotnost	Hmotnost 1 molekuly	Počet molekul v 1g
Savci	$3,0 \times 10^9$	$1,95 \times 10^{12}$		
Drosophila	$1,2 \times 10^8$	$7,80 \times 10^{10}$		
<i>S. cerevisiae</i>	$1,6 \times 10^7$	$1,04 \times 10^{10}$		
<i>Zea mays</i>	$3,9 \times 10^9$	$2,54 \times 10^{12}$		
<i>Escherichia coli</i>	$4,0 \times 10^6$	$2,60 \times 10^9$		
Bakteriofág $\lambda$	48 514	$3,15 \times 10^7$		
pBR322	4 363			
pUC18	2 686			

Řešení

Hmotnost jedné molekuly

$6,023 \times 10^{23}$  molekul ..... má hmotnost ..... M (molární hmotnost) g  
 1 molekula ..... má hmotnost ..... x g

---


$$X = M / 6,023 \times 10^{23}$$

Počet molekul v 1g

$6,023 \times 10^{23}$  molekul ..... má hmotnost ..... M (molární hmotnost) g  
 x molekul ..... má hmotnost ..... 1 g

---


$$X = 6,023 \times 10^{23} / M$$

**Odpověď:**

Organismus	Velikost DNA (bp)	Molární hmotnost	Hmotnost 1 molekuly	Počet molekul v 1g
Savci	$3,0 \times 10^9$	$1,95 \times 10^{12}$	$3,24 \times 10^{-12} \text{g}$	$3,09 \times 10^{11}$
Drosophila	$1,2 \times 10^8$	$7,80 \times 10^{10}$	$1,30 \times 10^{-13} \text{g}$	$7,72 \times 10^{12}$
<i>S. 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>Zea mays</i>	$3,9 \times 10^9$	$2,54 \times 10^{12}$	$4,22 \times 10^{-12} \text{g}$	$2,37 \times 10^{11}$
<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 $\lambda$	48 514	$3,15 \times 10^7$	$5,23 \times 10^{-17} \text{g}$	$1,91 \times 10^{16}$
pBR322	4 363	$2,8 \times 10^6$	$4,65 \times 10^{-18} \text{g}$	$2,15 \times 10^{17}$
pUC18	2 686	$1,7 \times 10^6$	$2,82 \times 10^{-18} \text{g}$	$3,54 \times 10^{17}$

Máte k dispozici linearizovanou dsDNA fága  $\lambda$  o koncentraci 50ug/ml

- Kolik molekul obsahuje 1ml tohoto roztoku?
- Kolik je to molů v 1 ml?
- Jaká je molární koncentrace molekul dsDNA fága v roztoku?
- Jaká je molární koncentrace konců molekul dsDNA fága v roztoku?

Řešení

a)

Máte k dispozici 50ug dsDNA fága

6,023 x 10 <sup>23</sup> molekul	.....	má hmotnost	.....	3,1 x 10 <sup>7</sup> g
x molekul	.....	má hmotnost	.....	50 x 10 <sup>-6</sup> g

---

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 50 \times 10^{-6} / 3,1 \times 10^7 = 9,71 \times 10^{11} \text{ molekul}$$

Odpověď:

Jeden ml roztoku fága  $\lambda$  obsahuje asi **9,71 x 10<sup>11</sup> těchto molekul** (literatura udává 9,78, to ale záleží na tom, jaká M se použije pro nukleotid)

b)

1 mol	.....	6,023 x 10 <sup>23</sup> molekul
x molů	.....	9,71 x 10 <sup>11</sup> molekul

---

$$X = 9,71 \times 10^{11} / 6,023 \times 10^{23} = 1,61 \times 10^{-12} \text{ molů}$$

Odpověď:

Jeden ml roztoku fága  $\lambda$  obsahuje asi **1,61 x 10<sup>-12</sup> molů molekul tohoto fága**

c)

Odpověď:

**Molární koncentrace molekul za výše uvedených podmínek je 1,61 x 10<sup>-9</sup> molů = 1,61nM**, protože molární koncentraci počítáme v 1 litru. Kdybychom měli výše uvedených molekul 1 litr, bylo by jich 10<sup>3</sup> x více.

d)

Odpověď:

**Molární koncentrace konců je 3,22 protože konců je 2x tolik než jenom vlastních molekul**

Jaká byla původní koncentrace DNA ve vzorku, jestliže po jeho naředění v TE pufru v poměru 1:9 vykazoval stejnou intenzitu záření jako vzorek standardu o koncentraci 25 ng/μl? Jak vzorku, tak standardu jste nanесли na gel 5 μl.

Řešení

5 μl standardu	.....	o koncentraci 25 ng/μl	.....	je celkem 125 ng DNA
5 μl vzorku	.....	o koncentraci X	.....	je 10 x 125 ng DNA
5 μl vzorku	.....	o koncentraci X	.....	je 1 250 ng DNA

---

$$1\ 250\ \text{ng}/5\ \mu\text{l} = 250\ \text{ng}/\mu\text{l}$$

Odpověď:

**Původní koncentrace DNA ve vzorku byla 250 ng/μl**

Jak naředíte vzorek DNA o koncentraci 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tak, aby při nanesení 10 $\mu\text{l}$  na gel intenzita jeho záření odpovídala 5 $\mu\text{l}$  standardu o koncentraci 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  ?

Řešení

5  $\mu\text{l}$  standardu ..... o koncentraci 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  ..... je celkem 500  $\text{ng}$  DNA

$$600 \mu\text{g}/\text{ml} = 600 \text{ng}/\mu\text{l}$$

10  $\mu\text{l}$  vzorku ..... o koncentraci 600  $\text{ng}/\mu\text{l}$  ..... je celkem 6 000  $\text{ng}$  DNA

---

$$6\,000 \text{ng}/500 \text{ng} = 12\text{x}$$

**Odpověď:**

**Vzorek DNA naředíme 12x, tedy v poměru 1 díl DNA : 11 dílům pufru**

**Kolik molekul plasmidové DNA o velikosti 2 500 bp obsahuje 50 µl roztoku o koncentraci 100 ng/µl?**

Řešení

M (1 bp) = 650

1) *Určíme celkovou hmotnost plasmidové DNA v roztoku*

50 µl roztoku	.....	o koncentraci 100 ng/µl	.....	5 000 ng DNA
		5 000 ng = 5 µg		

2) *Vypočteme hmotnost jednoho plasmidu*

6,023 x 10 <sup>23</sup> bp	.....	má hmotnost	.....	650 g
2 500 bp	.....	má hmotnost	.....	X g

---

$$X = 2\,500 \times 650 / 6,023 \times 10^{23} \text{ g} = 2,70 \times 10^{-18} \text{ g} = 2,70 \text{ pg}$$

3) *Vypočteme počet molekul*

1 molekula plasmidu	.....	má hmotnost	.....	2,70 x 10 <sup>-18</sup> g
Y molekul plasmidu	.....	má hmotnost	.....	5 x 10 <sup>-6</sup> g

---

$$Y = 5 \times 10^{-6} / 2,70 \times 10^{-18} = 1,85 \times 10^{12} \text{ molekul}$$

**Odpověď:**

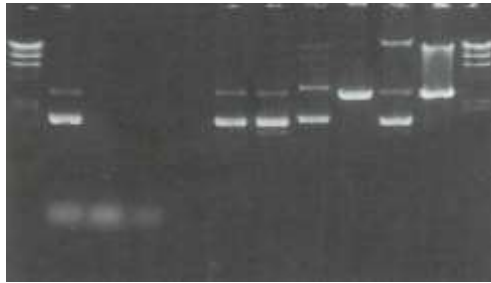
**Roztok obsahuje 1,85 x 10<sup>12</sup> molekul plasmidové DNA**

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

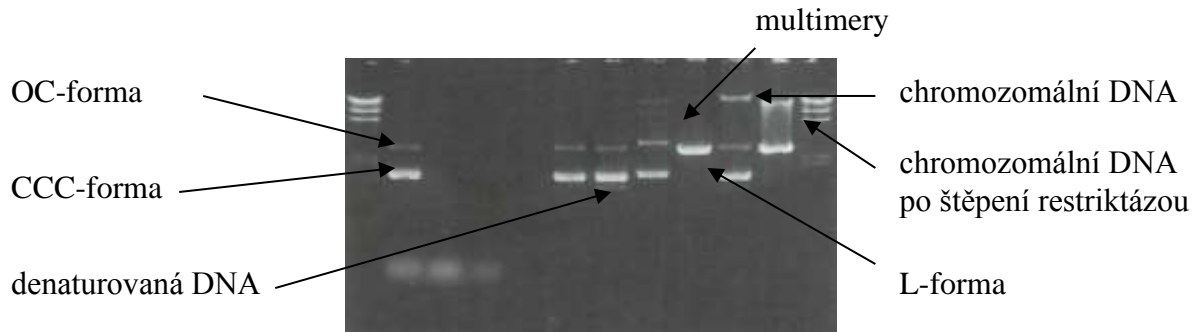
**Odpověď:**

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

Na uvedeném elektroforetickém snímku vyznačte různé formy plasmidu.



**Odpověď:**



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)

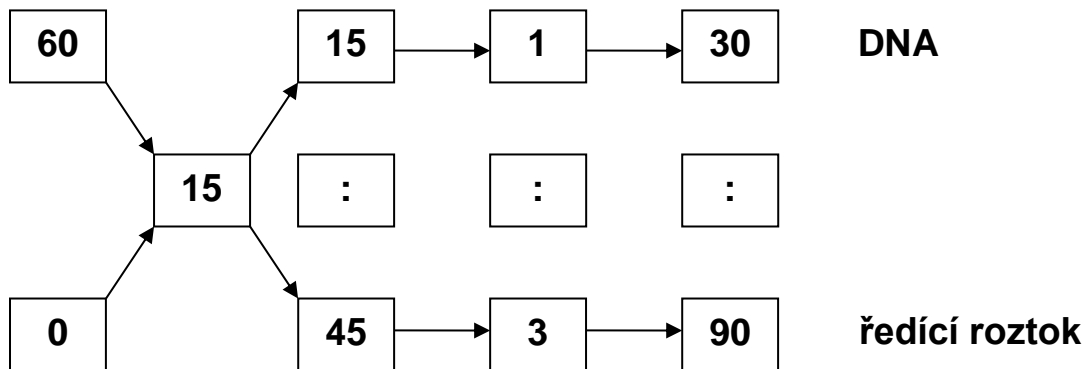


Kolik ředícího roztoku přidáte do 30  $\mu\text{l}$  vzorku DNA o koncentraci 60  $\mu\text{g/ml}$  tak, aby koncentrace DNA po zředění klesla na 15  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ?

Řešení

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

Použijeme směšovací pravidla



Odpověď:

Do vzorku DNA přidáme 90  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

**Jaké množství plasmidu (v  $\mu\text{l}$ ) přidáte do reakční směsi, potřebujete-li štěpit 500 ng plasmidu a je-li jeho zásobní koncentrace 100 ng/ $\mu\text{l}$  ?**

Řešení:

1 $\mu\text{l}$ zásobní koncentrace	.....	obsahuje	.....	100 ng plasmidu
X $\mu\text{l}$ zásobní koncentrace	.....	obsahuje	.....	500 ng plasmidu

---

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

**Odpověď:**

**Do reakční směsi přidáme 5  $\mu\text{l}$  plasmidu**

**Kolik molekul plasmidové DNA o velikosti 50 000 bp obsahuje 100 µl roztoku 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 µg/ml

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

1) *Určíme koncentraci plasmidové DNA v roztoku*

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

---

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

2) *Určíme celkovou hmotnost plasmidové DNA v roztoku*

75 µg/ml = 75 ng/µl

100 µl roztoku	.....	o koncentraci 75 ng/µl	.....	7 500 ng DNA
----------------	-------	------------------------	-------	--------------

3) *Vypočteme hmotnost jednoho plasmidu*

6,023 x 10 <sup>23</sup> bp	.....	má hmotnost	.....	650 g
50 000 bp	.....	má hmotnost	.....	Y g

---

$Y = 50\,000 \times 650 / 6,023 \times 10^{23} \text{ g} = 5,40 \times 10^{-17} \text{ g}$

4) *Vypočteme počet molekul*

1 molekula plasmidu	.....	má hmotnost	.....	$5,40 \times 10^{-17} \text{ g}$
Z molekul plasmidu	.....	má hmotnost	.....	$7\,500 \times 10^{-9} \text{ g}$

---

$Z = 7\,500 \times 10^{-9} / 5,40 \times 10^{-17} = 1,39 \times 10^{11} \text{ molekul}$

**Odpověď:**

**Roztok obsahuje  $1,39 \times 10^{11}$  molekul plasmidové DNA**

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

Řešení:

Velikost DNA fága  $\lambda$  = 48 502 bp

1) Spočítáme počet molekul fága  $\lambda$ , které enzym *Hinf*I rozštěpí

6,023 x 10 <sup>23</sup> molekul	.....	má hmotnost	.....	650 x 48 502 g
X molekul	.....	má hmotnost	.....	1 x 10 <sup>-6</sup> 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 10<sup>10</sup> molekul plasmidu pUC18

6,023 x 10 <sup>23</sup> molekul	.....	má hmotnost	.....	650 x 2 686 g
11,46 x 10 <sup>10</sup> 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**

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

Řešení:

Vyjdeme 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