

## PAGE sekundárních struktur DNA

Sekundárních struktury DNA jsou separovány při elektroforéze na základě celkové velikosti fragmentu, celkového záporného náboje a na tvaru. V této úloze bude separace ukázána na fragmentech telomerové D-loop (displacement) smyčky. Polyakrylamidová elektroforéza sekundárních struktur DNA bude provedena v předpřipraveném 8% nativním gelu, který obsahuje fluorescenční sondu Gel Red (Obr. 1). Po 30 minutové elektroforetické separaci bude gel se vzorky vyhodnocen na dokumentačním systému.

### Materiál:

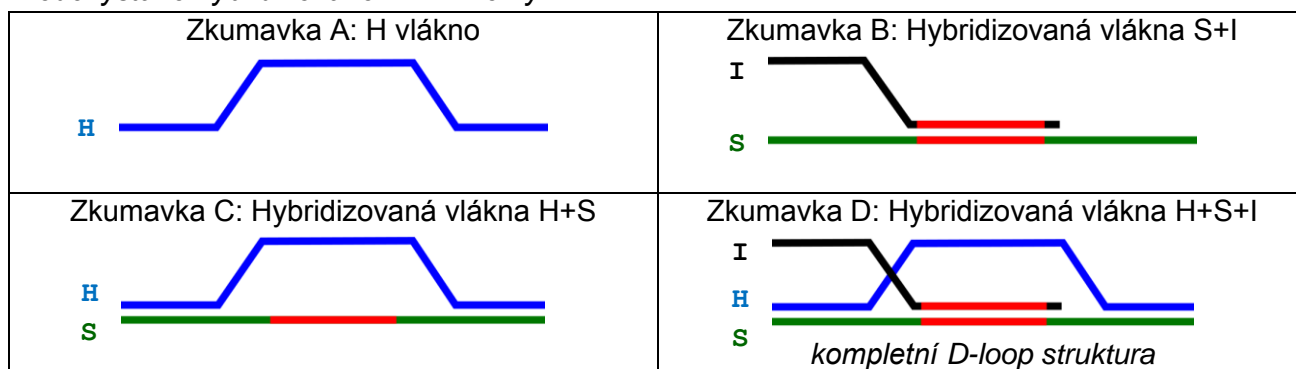
- Čtyři zkumavky s různými DNA strukturami: A, B, C, D ①
- 1x Hybridizační LiCl pufr (25 mM TRIS-HCl, 50 mM LiCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5) ②
- 6x Nanášecí barvička s glycerolem ③
- Předpřipravený 8% polyakrylamidový gel s příslušnou aparaturou a laboratorním zdrojem
- 0,5x TBE pufr (44,5 mM TRIS-HCl, 44,5 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA)
- Transiluminátor

### Postup:

- V každé zkumavce ① (A - D) jsou 3 pikomoly DNA s různou sekundární strukturou v objemu 1,5 µL.
- Přidejte do každé zkumavky ① s předpřipravenou DNA 6 µL hybridizačního pufru ② kvůli naředění vzorku za účelem lepšího nanášení na gel.
- Přidejte do každé zkumavky ① potřebné množství barvičky ③, tak aby její konečná koncentrace byla 1x (zásobní je 6x).
- Do sestavené aparatury s 8% polyakrylamidovým gelem naneste jednotlivé vzorky do příslušných jamek podle následujícího schéma:   
 ----- A B C D -----  
 Ostatní jamky nechejte prázdné.
- Zavřete aparaturu a spusťte běh gelu s nastavením elektroforetického zdroje na program: 50 V 10 minut, poté 10 mA 20 minut.
- Po doběhnutí programu rozložte aparaturu, opatrně oddělte gel z prostoru mezi skly a pozorujte výsledek (na trasiluminátoru nebo na jiném elektroforetickém dokumentovacím systému).

### DNA materiál:

Předchystané hybridizované DNA vzorky:

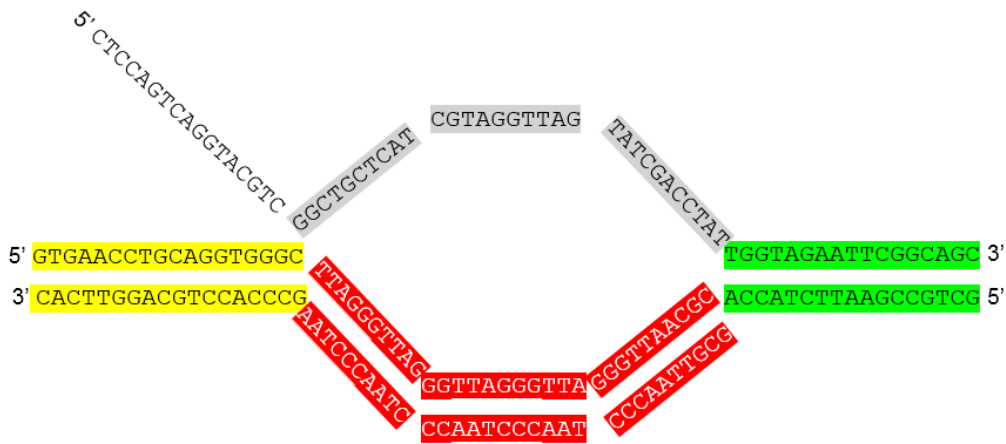


Sekvence jednotlivých vláken:

H: 5' - GTGAACCTGCAGGTGGGC GGCTGCTCATCGTAGGTTAGTATCGACCTAT TGGTAGAATTCCGGCAGC -3'

S: 3' - CACTTGGACGTCCACCCG AATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATT GCG ACCATCTTAAGCCGTCG -5'

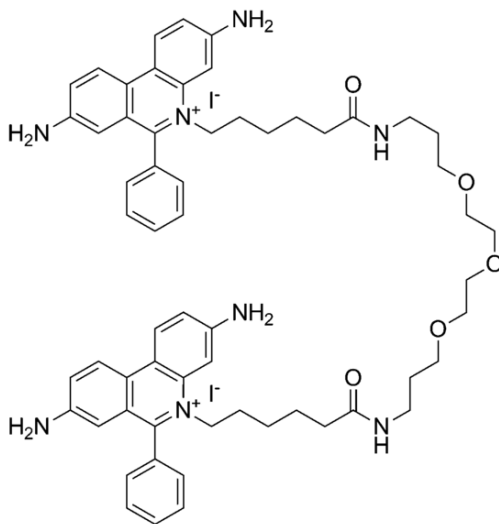
I: 5' - CTCCAGTCAGGTACGTC TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTACGC -3'



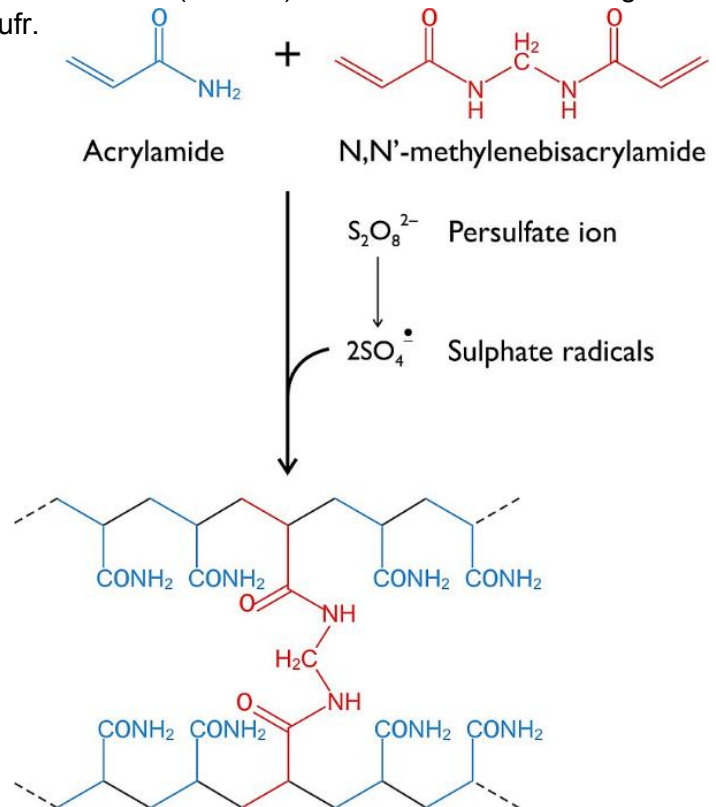
Kompletní D-loop struktura po hybridizaci

### 8% polyakrylamidový gel:

- Tloušťka gelu je 0,75 mm, s 15 jamkami. K přípravě byl použit (bis-)akrylamid (1:19).
- Gel obsahuje barvičku „Gel Red Nucleic Acid Stain“ (Biotium) – barví veškerou DNA v gelu.
- Katodový i anodový pufr je 0,5x TBE pufr.



Obr. 1 Gel Red Nucleic Acid Stain



Obr. 2 Polymerizační reakce akrylamidu a bisakrylamidu.

### Komentář cvičitele Pavla:

Důležité je si uvědomit, že se v případě sekundárních struktur DNA neřeší pouze migrace na základě celkové velikosti fragmentu a celkového záporného náboje, ale i na tvaru. Ten je zachován díky nativnímu akrylamidovému gelu.

Otázka: Proč byl použit zrovna (bis-)akrylamid (1:19), když tu máme i jiné poměry (1:37,5 či 1:29)? Respektive co nám tento poměr udává?

Tento poměr nám definuje hustotu pórů gelu – jak budou polymerizovat „řádky“ a „sloupce“.  
1:19 je vhodný na separaci DNA, 1:37,5 je vhodný na separaci proteinů, a 1:29 pro směs DNA/protein, případně pro krátký peptid/protein.

-> Prvním vaším praktickým úkolem by bylo přidat ke vzorkům DNA pufr a nanášecí barvičku.

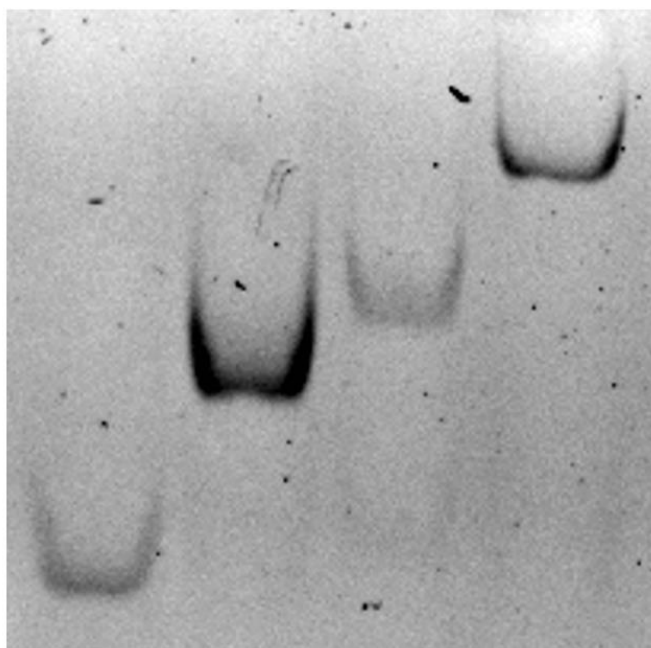
Otázka: Kolik bude potřeba přidat barvičky ke směsi, aby byla její výsledná koncentrace 1x?

Máme  $1,5 + 6 = 7,5 \mu\text{L}$  a k tomu budeme přidávat 6x zásobní barvičku.  
 $7,5/5 = 1,5 \mu\text{L}$  barvičky přidáme.

Získáváte 9  $\mu\text{L}$  vzorku, který byste nanášeli do jamek předpřipraveného gelu – smyslem bylo, abyste si vyzkoušeli nanášení vzorku do 0,75mm tlustého gelu – což není tak jednoduché, jak to vypadá. Mezery mezi vzorky jsou tam z důvodu přetékání vzorku, když to náhodou někdo nezvládl správně.

Proč se používají dvě různé kombinace nastavení elektroforetického zdroje (50 V 10 minut, poté 10 mA 20 minut)?

Naše vzorky nejdříve pomalu (= rovnoměrně) zaputovávají do struktury gelu a poté to zrychlíme.



H      S+INV      H+S      H+S+INV  
A      B      C      D

Gely by se fotily na elektroforetickém dokumentovacím systému s UV transiluminátorem. 3 pikomoly DNA na jamku jsou hraniční množství, které jsme schopni na přístroji *Fusion* detekovat – někdy si musíme vypomoci s úpravou histogramu za účelem potlačení signálu pozadí.

-> Separace vzorků dopadla dle očekávání:

Nejjednodušší sekundární struktura putuje nejrychleji, naopak nejsložitější struktura má nejvíce potíží „protáhnout“ se póry gelu a je tím pádem nejvíce zpoždována.

Doplňující otázka: Proč zkumavka B a D mají vyšší intenzitu bandu na gelu, než A a C?

„I“ neboli „INV“ vlákno je navíc značeno fluoroforem. UV záření z transiluminátoru ho částečně excituje a my ho tím pádem vidíme více intenzitně.