

DNA i RNA

- (1) Rozdział RNA oraz fragmentów DNA metodą elektroforezy w żelu agarozowym, określenie wielkości fragmentów DNA (produktów PCR) na podstawie porównania z obrazem rozdziału standardów.**
- (2) Pomiar widma absorpcyjnego DNA. Denaturacja termiczna DNA, efekt hiperchromowy. Renaturacja.**
- (3) Wizualizacja modelu helisy B DNA oraz kompleksu DNA-białko (program RasMol).**

WYMAGANE PRZYGOTOWANIE TEORETYCZNE:

- Denaturacja DNA – istota procesu, zależność denaturacji od składu zasad, czynniki denaturujące, temperatura topnienia, zależność wartości T_m od składu zasad występujących w cząsteczce DNA, odwracalność procesu i wykorzystanie w praktyce, efekt hiperchromowy.
- Ładunek elektryczny cząsteczek DNA i RNA. Zasada rozdziału elektroforetycznego fragmentów kwasów nukleonowych w żelu agarozowym, pH buforu, kierunek wędrówki łańcuchów, ładunek anody i katody, zależność ładunku i wielkości fragmentów kwasów nukleonowych od szybkości wędrówki w żelu.
- Zasada techniki PCR. Rola poszczególnych składników (substratów) mieszaniny reakcyjnej.

Wprowadzenie:

Efekt hiperchromowy

Oznaczenia spektrofotometryczne są stosowane zarówno w analizie ilościowej jak i jakościowej kwasów nukleonowych. Kwasy nukleonowe, ze względu na obecność zasad purynowych i pirymidynowych, absorbują promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie ultrafioletu, z maksimum absorpcji przy długości fali około 260 nm. Poza wiązaniami wodorowymi łączącymi komplementarne zasady, ważnymi oddziaływaniami stabilizującymi natywną strukturę DNA są oddziaływania hydrofobowe pomiędzy pierścieniami zasad sąsiednich par nukleotydów (*stacking interactions*). Natywna cząsteczka DNA, która na całej lub prawie całej długości stanowi podwójną helisę, wykazuje mniejszą absorbancję przy 260 nm niż teoretyczna absorbancja wyliczona w oparciu o skład zasad. Rozplecenie podwójnej helisy DNA w procesie denaturacji spowodowanej ogrzewaniem roztworu DNA, wiąże się ze zrywaniem zarówno wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi parami zasad jak też wspomnianych warstwowych oddziaływań między płaszczyznami zasad. Uzyskanie przez zasady nukleonowe - w wyniku denaturacji DNA- większej swobody powoduje wzrost absorbancji roztworu zdenaturowanego DNA, nawet o 40% jej wartości wyjściowej. Przeciętnie wzrost ten sięga około 20%. Efekt ten - nazywany efektem hiperchromowym - można wykorzystać do wyznaczania temperatury topnienia (T_m) DNA, czyli temperatury, w której cząsteczka DNA jest zdenaturowana w 50%. Można go też wykorzystać do śledzenia procesu renaturacji DNA. Denaturacja DNA jest bowiem procesem odwracalnym – po ostudzeniu próbek następuje stopniowe odtwarzanie struktury dwuniciowej.

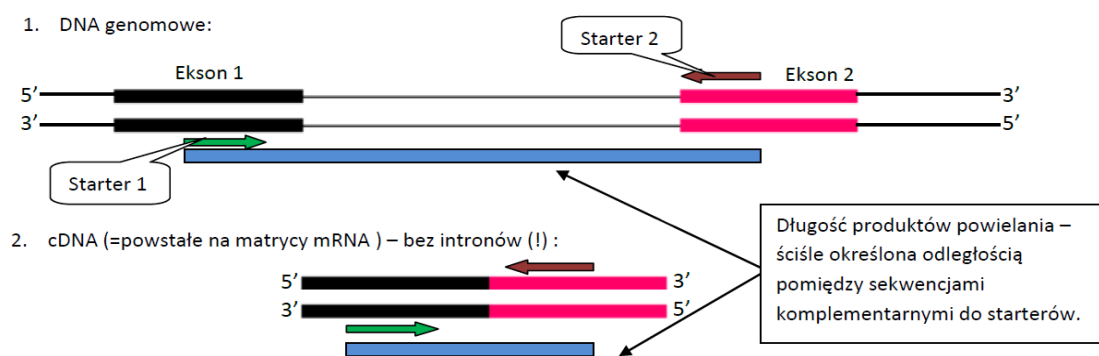
Elektroforeza kwasów nukleonowych w żelu agarozowym

Podczas rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym (w buforze o pH 8.0) cząsteczki DNA i RNA wędrują do anody (+), a szybkość wędrówki jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości fragmentu DNA. Rozdzielając równocześnie z badanymi próbkami mieszaninę fragmentów o znanych wielkościach (standardy), można oznaczyć wielkość (czyli długość wyrażoną liczbą par zasad – pz) analizowanego fragmentu. Polinukleotydy są wykrywane w żelu np. za pomocą bromku etydyny – barwnika interkalującego pomiędzy pary zasad w helisie i

intensywnie fluoryzującego w świetle UV. **Jako czynnik interkalujący, bromek etydyny jest silnym mutagenem, dlatego należy zachować szczególną ostrożność podczas pracy z tym odczynnikiem!**

Reakcja łańcuchowa polimerazy – PCR

Technika PCR (*polymerase chain reaction*) pozwala na powielenie (i szybkie uzyskanie ogromnej liczby kopii) wybranego fragmentu DNA, określonego sekwencjami komplementarnymi do syntetycznych, specjalnie zaprojektowanych starterów. Cząsteczka matrycowa rozdzielana jest na pojedyncze nici w wysokiej temperaturze (ponad 90°C), po ochłodzeniu do ok. 60°C zachodzi przyłączenie starterów (zgodnie z regułą komplementarności), a następnie (w około 70°C) synteza nowych nici, katalizowana przez termostabilną polimerazę DNA. Cykl denaturacji, przyłączania starterów i polimeryzacji jest powtarzany wielokrotnie, pozwalając na przyrost produktów reakcji w postępie geometrycznym. W przybliżeniu: po 30 cyklach reakcji (co trwa około godziny) można uzyskać 2^{30} (czyli ok. 1×10^9 !) **kopii wybranego fragmentu. W reakcji PCR do reakcji wykorzystywany jest DNA. W reakcji RT-PCR wykorzystywany jest cDNA, powstały w reakcji poprzedzającej reakcję powielania (PCR), w wyniku której syntetyzuje się cDNA z wyizolowanego RNA. Analizując wyniki reakcji PCR i RT-PCR trzeba uwzględnić różnicę wynikającą z obecności w DNA intronów. Schemat wyjaśnia przyczynę różnicy w długości powielanego DNA genomowego oraz cDNA:**



W celu zobrazowania wyników reakcji PCR i RT-PCR należy wykonać elektroforezę, na podstawie której będzie możliwe porównanie uzyskanych prążków (ich ilości, intensywności i położenia) z markerem (standardem o ściśle określonym położeniu prążków).

Na ćwiczenia przygotuj informację na temat reakcji:

- syntezy cDNA (jakie substraty– odczynniki, oprócz RNA są potrzebne, z jakich etapów się składa)
- PCR (jakie substraty – odczynniki, oprócz DNA są potrzebne, z jakich etapów się składa)

Zawartość kwasów nukleinowych w komórce człowieka:

Komórki somatyczne (diploidalne) zawierają 23 pary chromosomów, których DNA ma łączną długości 6×10^9 par zasad. Ta ilość DNA wyrażona wagowo to 3pg (3×10^{-12} g).

Ilość RNA w komórce jest zmienna i zależy od typu komórki i jej stanu funkcjonalnego (np. jest wyższa w - zawierających liczne rybosomy - komórkach wydzielających białka.

Przeciętnie jedna komórka zawiera około 0.01 ng (1×10^{-11} g) RNA całkowitego, w którym dominuje (80 %) rRNA (28S, 18S, 5.8S i 5S). tRNA stanowi 10-15%, a mRNA (najbardziej

zróznicowane!) stanowi od 2-5%. Poniżej 1% stanowią snRNA (małe jądrowe RNA), mikro-RNA, i małe interferencyjne RNA (siRNA).

WYKONANIE:

I. Denaturacja DNA

- Zarejestruj widmo roztworu dwuniciowego DNA względem wody destylowanej w zakresie od 200 do 300 nm. Zapisz wartość absorbancji przy 260 nm. Naszkicuj widmo.
- Następnie przygotuj dwie długie probówki, do jednej z nich wlej 4mL roztworu DNA a do drugiej wodę destylowaną, obie umieść na ok. 10 minut we wrzącej łaźni wodnej.
- Przemyj (ogrzej) kuwetę gorącą wodą destylowaną, a następnie wlej do niej roztwór gorącego DNA i wykonaj pomiar widma DNA (względem wody) w zakresie długości fali 200 - 300 nm. Zapisz wartość absorbancji przy 260 nm. Naszkicuj widmo.
- Pozostaw roztwór DNA w temperaturze pokojowej. Po 10 i 30 minutach ponownie wykonaj pomiary widma. Zapisz wartości absorbancji przy 260 nm.

II. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA w żelu agarozowym

1. Przygotowanie 3% żelu agarozowego do elektroforezy (**wykonuje pracownik Katedry**).
W poziomej komorze elektroforetycznej wylana została warstwa 3% żelu agarozowego, który zawiera 0,5 µg/ml bromku etydyny. Żel sporządzony jest w buforze Tris-kwas octowy o pH 8,0. W warstwie żelu uformowano „studzienki”, we wnętrzu których umieszczone zostaną próbki analizowanych roztworów. Po obu stronach żelu znajdują się zbiorniki z buforem elektrodowym, w których zanurzone są elektrody.
2. Elektroforeza wstępna (**ten etap i następne wykonują studenci, pod kierunkiem asystenta prowadzącego ćwiczenia**).
Przed wprowadzeniem do żelu analizowanych próbek należy włączyć, na około 15 minut zasilacz doprowadzający prąd elektryczny do urządzenia, tak, aby natężenie prądu nie przekraczało 60 mA.
3. **Przygotowanie próbek do elektroforezy.**
Do każdej z próbek, zawierających w objętości **10 µl** fragmenty DNA dodać (za każdym razem czystą końcówką pipety!), po **2 µl** roztworu sacharozy o dużej gęstości, zawierającej barwniki wskaźnikowe. Objętość każdej z mieszanin (**10 µl**) należy następnie wprowadzić do odpowiednich studzienek w żelu agarozowym. (**PRACUJ W RĘKAWICZKACH !!!!!**).

Rozdzielane próbki to:

- DNA 1 – produkt powielenia metodą PCR fragmentu genomowego DNA 1 z komórek prostaty
- cDNA 1 – produkt powielenia metodą PCR fragmentu cDNA 1(RNA z komórek prostaty)
- Standard pUC
- DNA 2 - produkt powielenia metodą PCR fragmentu genomowego DNA 2 z fibroblastów
- cDNA 2 - produkt powielenia metodą PCR fragmentu cDNA 2 (RNA z fibroblastów)
- Całkowite RNA i DNA wyizolowane z komórek prostaty człowieka,

Schemat nakładania próbek do rozdziału elektroforetycznego:

	Nr studzienki	Próbka
Górna część żelu	1	-
	2	cDNA 1
	3	DNA 1
	4	Standard pUC
	5	cDNA 2
	6	DNA 2
	7	-
	8	-
Dolna część żelu	1	-
	2	RNA 1 całkowite
	3	RNA 2 całkowite
	4	-
	5	DNA 1 całkowite
	6	DNA 2 całkowite
	7	-
	8	-

Rozdzielane próbki to:

Po izolacji z komórek prostaty:

„cDNA 1” – produkt powielenia metodą PCR fragmentu cDNA „1” (kwaśna fosfataza)

„DNA1” – produkt powielenia metodą PCR fragmentu genomowego DNA „1” (kwaśna fosfataza)

Standard pUC

Po izolacji z fibroblastów:

„cDNA 2” - produkt powielenia metodą PCR fragmentu cDNA „2” (kolagen)

„DNA 2” - produkt powielenia metodą PCR fragmentu genomowego DNA „2” (kolagen)

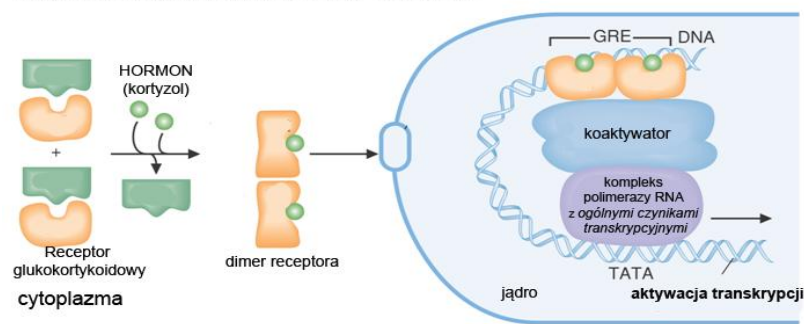
Całkowite RNA i DNA wyizolowane z 2 różnych linii komórkowych prostaty człowieka (nr 1 i 2),

4. Rozdział elektroforetyczny należy prowadzić przez 15-20 minut przy natężeniu prądu 60 mA.
5. Po zakończeniu elektroforezy przenieś żel, na około 2 minuty, do naczynia z wodą destylowaną.
(PRACUJ W RĘKAWICZKACH gdyż żel zawiera mutagenny bromek etydyny!!!)
6. Wodę z bromkiem etydyny należy zlać do specjalnie przygotowanego oznaczonego naczynia!
7. Żel agarozowy umieszcza się w transiluminatorze emitującym światło ultrafioletowe. Fluorescencja bromku etydyny w kompleksach z polinukleotydami pozwala stwierdzić ich obecność w analizowanym żelu. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do ilości kwasów nukleinowych w prążkach.
8. Wykonaj szkic obrazu rozdziału (można dla ułatwienia zrobić zdjęcie żelu).
Żel agarozowy, po obejrzeniu, umieszczamy w specjalnie przygotowanym pojemniku!

III Wizualizacja modeli czasteczek DNA

Studenci obserwują i analizują model fragmentu helisy B DNA oraz model fragmentu DNA w kompleksie z białkiem regulatorowym zawierającym elementy strukturalne typu *paluszków cynkowych*.

Regulacja transkrypcji przez hormony steroidowe



Uruchom program RasWin (ikona na pulpicie).

A. Wybierz z menu na górze: **File** → **open** → **IBNA** (otwórz ten plik).

1. Pojawi się model „drucikowy” - „wireframe” podwójnej helisy B DNA, złożony z dwóch 12-to nukleotydowych nici.
2. Po przytrzymaniu lewego przycisku myszy można sobie ten model poobracać i pooglądać strukturę
3. Zmień tło na białe: w **Rasmol Command Line**” wpisz: **background white** i naciśnij ENTER (↵).
4. Zmień widok na model „spacefill”. W tym celu w pasku zadań w górze okna wybierz: **display** → **spacefill** i **colours** → **chain**

Każdy z łańcuchów będzie widoczny innym kolorem. Żeby ukryć niepotrzebne atomy w „Rasmol Command Line” wpisz: **select hetero** ↵ po czym wybierz z menu na górze: **display** → **wireframe**.

Poobracaj helisę, zwróć uwagę na obecność bruzd i ściśle dopasowanie zasad.

5. W **Rasmol Command Line** wpisz: **select all** ↵ i wybierz z menu na górze: **Colours** → **CPK**

W tej opcji kolor czerwony to atomy tlenu, żółty to P, C- szary, N- niebieski.

Zwróć uwagę na to, że grupy fosforanowe znajdują się na powierzchni helisy!

6. Wybierz: **Display** → **sticks** . Ustaw helisę tak, żeby jej oś była prostopadła do ekranu. Ponownie zwróć uwagę na położenie deoksyryboz, grup fosforanowych i zasad azotowych. Poobracaj helisę, żeby lepiej ją oglądnać.

Ponownie zmień widok na „drucikowy” : **Display** → **wireframe**, **Colours** → **chain**. Wybierz : **Options** → **labels** – pojawią się etykiety dla poszczególnych nukleotydów:

W **Rasmol Command Line** wpisz: **select DT8A** ↵ (mogą być male literary!!!), wybierz: **display** → **spacefill**

W **Rasmol Command Line** wpisz: **select DA17B** ↵, wybierz: **Display** → **spacefill**

Poobracaj helisę, zwróć uwagę na ściśle dopasowanie komplementarnych zasad.

W **Rasmol Command Line** wpisz: **select DG16B** ↵, i potem **Colour** → **Red** ↵; wybierz: **Display** → **spacefill**

W **Rasmol Command Line** wpisz: *select DC9A* ← i *Colour* → *yellow*, wybierz: *Display* → *spacefill*

Zwróć uwagę na wzajemne ułożenie i ściśle dopasowanie sąsiednich par zasad! Poobracaj model, żeby go lepiej zobaczyć.

7. Wybierz *Settings* → *pick distance* i zmierz odległości: (W celu zmierzenia odległości należy raz kliknąć w pierwszy z atomów i raz w drugi – na obrazku oraz w *RasMol Command Line* wyświetli się dystans między nimi w Å (czyli 10^{-10} m).)

- długość jednego skrętu (10 pz) fragmentu – czyli np. odległość pomiędzy DG2A a DG12A.
- średnicę helisy

8. Wydrukuj otrzymany obraz cząsteczki.

B. Wybierz z menu na górze: *File* → *open* → *IP47* (otwórz ten plik).

1. Pojawi się model „drucikowy” - „*wireframe*” kompleksu fragmentu DNA z białkiem o strukturze „paluszków cynkowych”.

↕ Zmień tło na białe: w **Rasmol Command Line**” wpisz: *background white* ←

3. Zmień widok na model „sticks”. W tym celu w pasku zadań w górze okna wybierz: *display* → *sticks* i *colours* → *group*.

4. Każdy z łańcuchów DNA będzie widoczny innym kolorem (niebieskim i turkusowym). Żeby wyróżnić białko, w „**Rasmol Command Line**” wpisz: *select protein* ← , i *colour yellow* po czym wybierz z menu na górze: *display* → *ribbons*. w „**Rasmol Command Line**” wpisz: *select DNA* ← , po czym wybierz z menu na górze: *display* → *spacefill*.

5. Poobracaj helisę, zwróć uwagę na dopasowanie odcinków alfa-helikalnych białka do większej bruzdy DNA.

6. W **Rasmol Command Line** wpisz: *select Zn* ← i *colour red* ← i wybierz z menu na górze: *display* → *spacefill*. Pojawią jony cynku.

7. W **Rasmol Command Line** wpisz: *select cys* ← i *colour orange* ← i wybierz z menu na górze: *display* → *Ball and stick*. Pojawią się reszty Cys kompleksujące jony Zn.

8. W **Rasmol Command Line** wpisz: *select his* ← i *colour magenta* ← i wybierz z menu na górze: *display* → *Ball and stick*. Pojawią się reszty His, też uczestniczące w wiązaniu jonów Zn.

9. Zmień kolor helisy: w „**Rasmol Command Line**” wpisz: *select DNA* ← i *colour white* . Wydrukuj otrzymany obraz cząsteczki.

10. W **Rasmol Command Line** wpisz: *select protein* ← i wybierz z menu na górze: *display spacefill*. Zwróć uwagę na ściśle dopasowanie białka do helisy DNA.

imię i Nazwisko

data:

grupa:

Sprawozdanie z ćwiczeń laboratoryjnych z biochemii

Ćwiczenie X - kwasy nukleinowe DNA i RNA

I. Denaturacja DNA i efekt hiperchromowy.

1. Dołącz lub naszkicuj wykres widma absorpcyjnego DNA z zaznaczonym maksimum absorpcji.

Wyjaśnij, które z elementów cząsteczki są odpowiedzialne za pochłanianie światła UV.

2. W tabeli wpisz wartości A_{260} próbki przed i po denaturacji:

	próbka	A_{260}	% zmiany*
1	Dwuniciowe DNA		-
2	DNA Po ogrzaniu do 100 °C		
3	10 min po ostudzeniu		
4	30 min po ostudzeniu		

*dla próbki 2 obliczyć zmianę względem próbki 1 a dla próbek 3 i 4 obliczyć zmianę względem próbki 2.

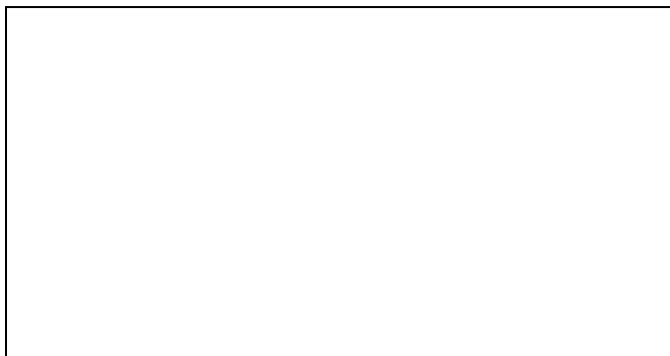
WNIOSKI:

Jak procentowa zawartość par CG i AT w DNA wpłynie na wartość temperatury topnienia?

Jakie szczególne funkcje pełnią w DNA rejony bogate w pary AT?

II. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA w żelu agarozowym

1. Narysuj schemat obrazu rozdziału próbek DNA i RNA w żelu (zaznacz pozycje startu, położenie anody i katody, kierunek wędrowania).



2. Porównując położenie fragmentów DNA w żelu z układem prążków w mieszaninie standardowej oszacuj wielkości fragmentów DNA w próbkach cDNA1 i DNA1

cDNA 1: pz

DNA 1: pz

Oba fragmenty są produktami reakcji PCR prowadzonej z użyciem takich samych starterów dla genu Z czego zatem wynika różnica w ich długości?

3. Porównując położenie fragmentów DNA w żelu z układem prążków w mieszaninie standardowej oszacuj wielkości fragmentów DNA w próbkach cDNA 2 i DNA 2

cDNA 2: pz

DNA 2 pz

Oba fragmenty są produktami reakcji PCR prowadzonej z użyciem takich samych starterów dla genu

WNIOSKI:

4. Opisz prążki próbki zawierające całkowite RNA wyizolowane z komórek. Jakie RNA jest obecne w dominujących prążkach RNA i dlaczego?

III. Wizualizacja DNA przy pomocy programu RasMol

A. DNA

1. Dołącz wydruk obrazu cząsteczki DNA
2. Podaj wartości:
 - Odległość pomiędzy sąsiednimi atomami P nici DNA [\AA]:.....
 - Średnica helisy [\AA]:.....
3. Wiedząc, że w komórce diploidalnej człowieka znajduje się DNA o łącznej długości około 6×10^9 par zasad i że na jeden skręt przypada 10 pz, oblicz (korzystając z powyższej wartości) jaka jest łączna długość [m] DNA w każdej z komórek. (Wpisz obliczenia a nie tylko wynik końcowy!)

B. Kompleks DNA-białko

Na podstawie modelu kompleksu DNA z białkiem regulatorowym (1P47) wyjaśnij:

- Które elementy białka (jaka struktura drugorzędowa) wiążą się z DNA i który z obszarów podwójnej helisy wiąże białko:

- Jakie reszty aminokwasowe wiążą jony Zn w „paluszkach cynkowych”?

- Białko 1P47 jest dimerem, zbudowanym z dwóch takich samych podjednostek. Czym zatem powinna się charakteryzować sekwencja DNA, która to białko wiąże?

LICZBA PUNKTÓW			Data:
Test	Wykonanie	Suma pkt.	Podpis asystenta: