

Kolo: Celoštátne

Kategória: A

Teoreticko-praktická časť – Praktická úloha č. 1

Molekulárna biológia

Restrikčná analýza plazmidovej DNA

Plazmidy sú kruhové molekuly DNA, nachádzajúce sa v bunkách baktérií a niektorých eukaryotov. Sú relatívne malé a obsahujú len niekoľko génov, vďaka ktorým dokážu tieto organizmy v krátkom čase reagovať na zmeny v okolitom prostredí. Plazmidy sa pomerne rýchlo replikujú a môžu byť prenášané medzi rôznymi bunkami, čo umožňuje napr. rýchle rozšírenie baktérií odolných voči pôsobeniu niektorých antibiotík. Okrem toho sú plazmidy tiež dôležitým nástrojom molekulárnej biológie, keďže sú základom pre molekulárne klonovanie a transformáciu buniek. V tejto úlohe sa naučíte za pomoci enzýmov štiepiacich molekuly DNA odlíšiť dva typy plazmidov.

Pomôcky: mikropipeta, sterilné špičky, prázdne skúmavky, skúmavky s plazmidovou DNA, enzýmami (BamHI, EcoRI, HindIII, XhoI) a tlmivými roztokmi, ukazovateľ molekulovej hmotnosti, nádoba so sterilnou vodou, krabica s ľadom, termoblok, stojan na skúmavky, elektroforetická aparatura, agarózový gél, transiluminátor s fotičkou

Úloha 1: Dizajn experimentu

Na odlíšenie plazmidov pBIO1 a pBIO2 použijete restrikčnú analýzu, ktorá spočíva v tom, že obidve neznáme vzorky inkubujete s enzýmom, ktorý poštiepi plazmidovú DNA charakteristickým spôsobom (bude možné pozorovať fragmenty určitej veľkosti). Podľa toho, aké fragmenty vzniknú štiepením vzoriek A a B, bude možné identifikovať jednu z nich ako plazmid pBIO1 a druhú ako plazmid pBIO2.

1. Ktorý enzým si vyberiete na štiepenie vzoriek, ak si môžete vybrať pre obe vzorky iba jeden zo štvorice BamHI, EcoRI, HindIII a XhoI, a zároveň chcete vždy pozorovať viac ako 1 fragment? Pri svojom rozhodovaní berte do úvahy informácie z plazmidových máp na druhej strane.

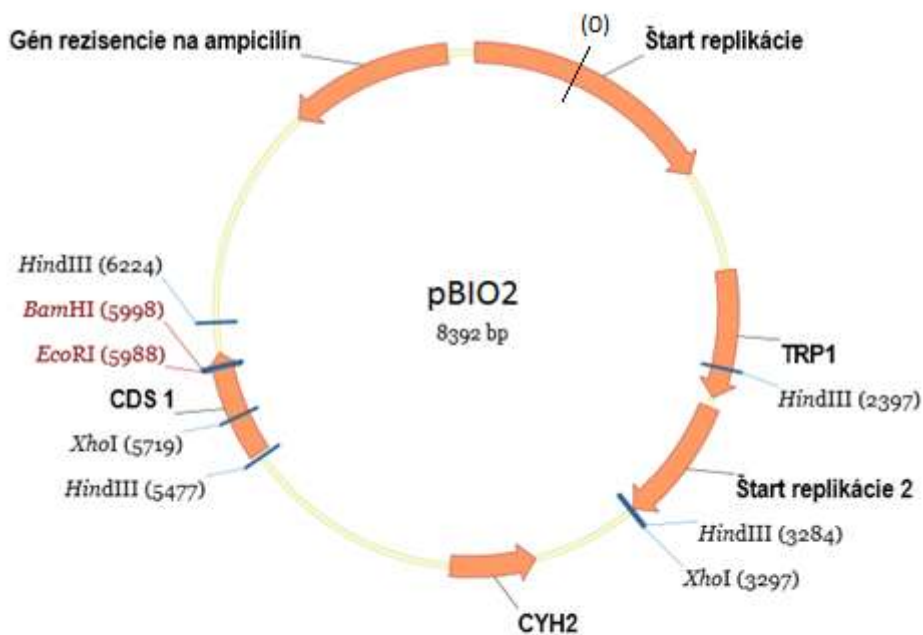
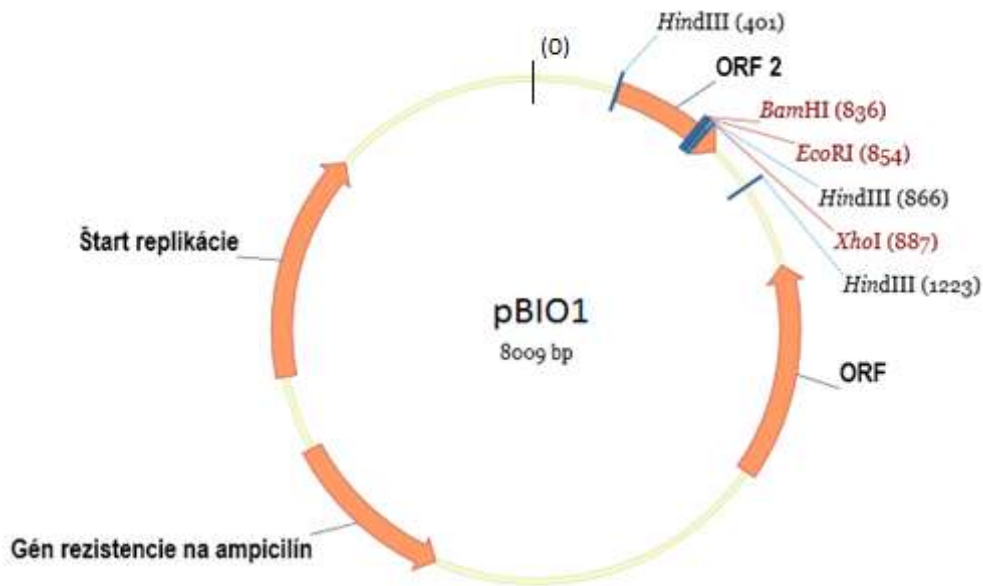
2. Koľko a akých veľkých fragmentov očakávate po štiepení v prípade, že štiepíte plazmid pBIO1, resp. pBIO2 enzýmom, ktorý ste vybrali?

Fragmenty pBIO1:

celkový počet:

Fragmenty pBIO2:

celkový počet:



Úloha 2: Príprava reakcie

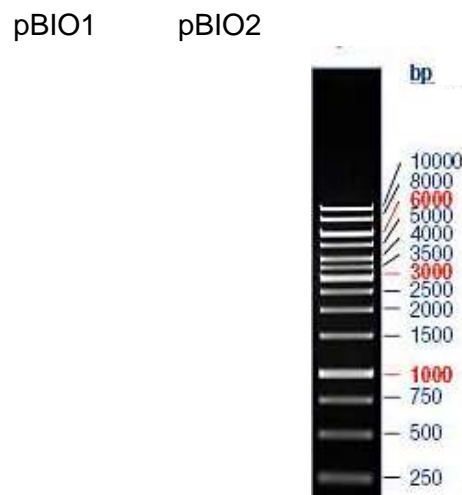
Do prázdnej skúmavky, označenej XA, resp. XB napipetujte 9,5 μ l (mikrolitra) sterilnej vody, 8 μ l plazmidovej DNA, 2 μ l tlmivého roztoku a 0,5 μ l enzýmu (enzým vám napipetuje vedúci úlohy). Reakčnú zmes pripravte zvlášť pre vzorku A a B. Pripravené zmesi vložte na 10 minút do termobloku a inkubujte pri 37°C.

- Enzýmy používané na štiepenie plazmidov sú vo väčšine prípadov izolované z rôznych druhov baktérií. Takmer všetky vykazujú najvyššiu enzýmovú aktivitu pri 37°C. Prečo?

Úloha 3: Elektroforetická analýza

10 μ l reakčnej zmesi opatrne naneste do jamiek v agarózovomgéli (ukazovateľ molekulovej hmotnosti naniesie vedúci úlohy), uistite sa, že je aparátúra pripravená a zapnite zdroj elektrického prúdu. Fragменты separujte 30 minút pri napätí 120 V.

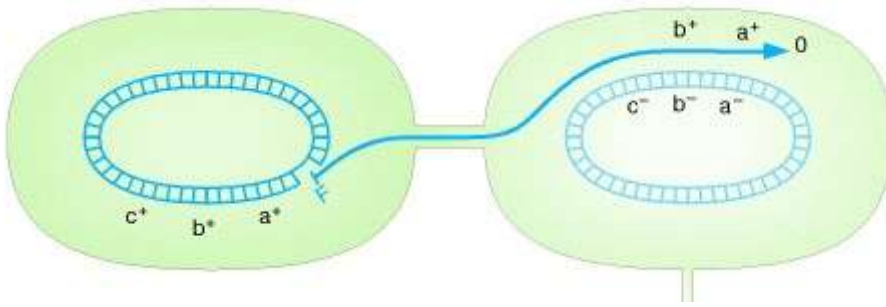
- Na obrázku je schematicky znázornený ukazovateľ molekulovej hmotnosti, ktorý sme použili v našom experimente. Je tvorený fragmentmi DNA definovanej veľkosti, ktoré sa počas elektroforetického delenia rozmiestnia od najväčšieho po najmenší. Zakreslite pod názvy jednotlivých plazmidov, kde očakávate, že sa budú nachádzať fragmenty DNA, získané ich štiepením.



- Ak by ste elektroforézu nechali zapnutú výrazne dlhšie ako je predpísané, akú zmenu pozorovania, popísaného v predošlej úlohe, by ste mohli očakávať?

Doplňujúce otázky:

- Niektoré plazmidy je možné použiť na konštrukciu genetických máp. V procese bakteriálnej konjugácie sú za pomoci plazmidu v niektorých prípadoch gény kopírované a prenášané z jednej bunky do druhej spôsobom ilustrovaným na obrázku. Väčšinou sa však bunkám nepodarí preniesť všetky gény, ale iba úsek DNA, obsahujúci niekoľko susediacich génov.

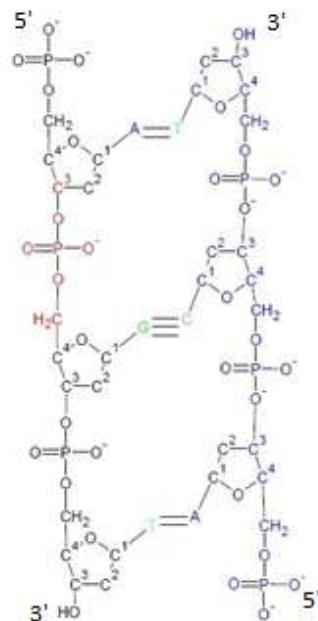


Analýzou takýchto prenesených úsekov ste identifikovali poradie génov, obsiahnutých v týchto úsekoch a následne sa pokúšate určiť poradie všetkých uvedených génov. Aké bude ich poradie, ak sa vám podarilo experimentálne získať nasledovné úseky?

- i. Y-S-K-O
- ii. I-C-A-L
- iii. S-Y-M
- iv. A-L-O-K

Poradie: _____

7. Každé vlákno DNA má 2 konce. Jeden je označovaný ako 5', druhý ako 3'. Zároveň platí, že dve komplementárne vlákna sú k sebe vždy opačne otočené (jedno je 5' -> 3', druhé 3' -> 5', pozri obrázok).



Navyše, vieme, že štiepiace enzýmy štiepia iba palindromatické sekvencie (tj. také, ktoré je možné prečítať v smere 5' -> 3' na oboch vláknach DNA rovnako). Do vyznačených polí doplňte komplementárne sekvencie a zakrúžkujte, ktorá z uvedených sekvencií je palindromatická.

- i. 5'ATTTTA 3'
3' 5'

- ii. 5' TGCCGT 3'
3' 5'
- iii. 5' TGATCA 3'
3' 5'
- iv. 5' ACCCGT 3'
3' 5'

8. Plazmidy patria medzi najpoužívanéjšie nástroje na vnášanie génov, pochádzajúcich z jedného organizmu, do iného organizmu. Aby tento systém fungoval, je potrebné (podobne ako v našom experimente) štiepiť kruhovú molekulu plazmidu štiepiacim enzýmom a následne do vzniknutej medzery vložiť požadovaný úsek DNA. Plazmid a vložená DNA sú na záver pevne spojené iným enzýmom. V súčasnosti sú plazmidy upravované tak, že väčšina štiepiacich enzýmov (na rozdiel od nášho experimentu) štiepi plazmid iba v jednom mieste. Prečo?

9. V bunkách prokaryotických aj eukaryotických mikroorganizmov sa okrem plazmidov nachádza aj ďalšia DNA, uložená vo forme chromozómu. Napíšte aspoň 3 rozdiely medzi eukaryotickými chromozómami a plazmidmi.

10. Plazmidy prechádzajú z jednej bunky do druhej v procese konjugácie, ktorý je riadený génmi nachádzajúcimi sa na plazmide, aj na chromozómoch. Existujú však aj častice, obsahujúce DNA, ktoré prenikajú do buniek samostatne a sú schopné dramaticky ovplyvňovať ich metabolizmus. Ako sa tieto častice nazývajú? Uveďte jeden príklad.

Výsledok experimentu

Vzorka A obsahovala plazmid _____

Vzorka B obsahovala plazmid _____

Autor: Mgr. Filip Červenák
Recenzia: Bc. Jaroslav Ferenc

Redakčná úprava: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.
Slovenská komisia Biologickej olympiády
Vydal: IUVENTA Slovenský inštitút mládeže, Bratislava 2016