

Priimek in ime:.....smer študija:.....skupina:.....

Izolacija kromosomske DNA iz goveje vranice in določanje hiperkromnega efekta

(Teorija je v skriptih na straneh 80-84, 87-88, 91-93.)

Namen vaje: Izolacija kromosomske DNA iz goveje vranice, spoznavanje strukturnih lastnosti DNA ter določanje hiperkromnega efekta.

Uvod: Kromosomska DNA služi za prenos dednih informacij na potomce in nosi zapis za sintezo v celici. Verigi v dvojni vijačnici DNA sta orientirani, njuni nukleotidni zaporedji pa sta Nukleotidi se v linearno polimerno verigo povezujejo preko..... vezi. Obe verigi v dvojni vijačnici povezujejo vezi. V evkariontski celici se kromosomska DNA nahaja v in je navita na bazične proteine.....

Potek dela:

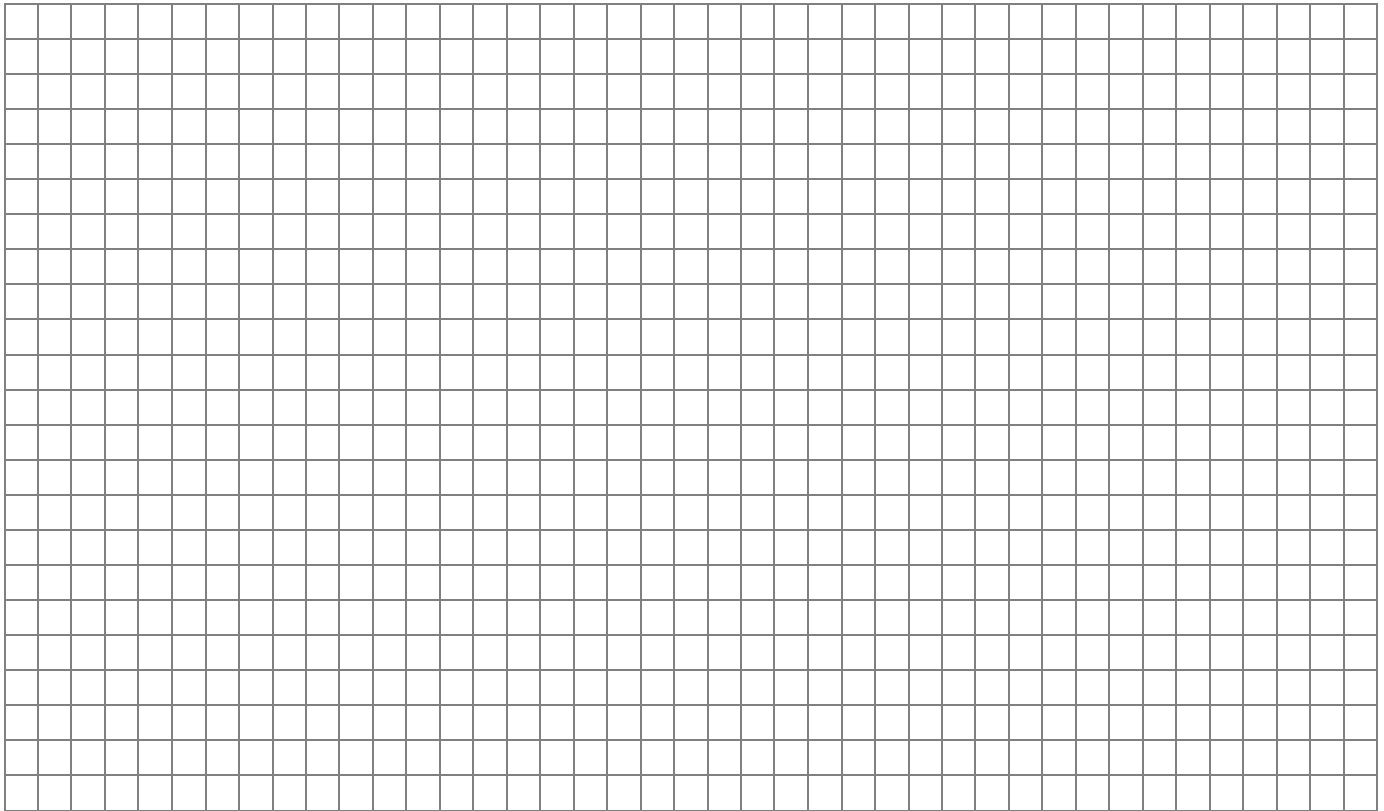
1. Pred vajo asistent homogenat goveje vranice odtali in doda 150 mL 15 mM Na-citratnega pufru, pH 7, ki vsebuje 0,15 M NaCl.
2. V 50 mL centrifugirko prelij 15 mL homogenata goveje vranice v citratnem pufru. Na tehtnici uravnateži svojo centrifugirko s kolego. Centrifugiraj 5 minut pri 5000 vrt./min v rotorju SS-34.
3. Supernatant zavrzi! Usedlino resuspendiraj v 15 mL 2 M NaCl in v digestoriju dolij 15 mL mešanice kloroform/izoamilni alkohol (6:1). Zapri centrifugirko in stresaj 3 min.
4. Uravnateži centrifugirke in centrifugiraj 15 minut pri 6000 vrt./min v rotorju SS-34.
5. Zgornjo vodno fazo s kapalko previdno prenesi v čašo in dolij 30 mL ledenomrzlega etanola. Izoborjeno DNA navij na palčko in pritisni ob steno čaše, da iztisneš tekočino.
6. DNA, navito na palčki, raztopi v 5 mL 0,15 M NaCl. Če je raztopina motna, jo centrifugiraj 2 minuti pri 5000 vrt./min v rotorju SS-34. Bistro raztopino asistent razredči z 0,15 M NaCl do A_{260} okoli 1.
7. V 8 epruvet odpipetiraj po 1,5 mL raztopine DNA. V 4 epruvete dodaj po 1,5 mL pufru pH 7, v 5 epruvet pa po 1,5 mL pufru s pH vrednostjo 2, 4, 7, 10 in 14.
8. Tri epruvete za toplotno denaturacijo (pufer pH 7) inkubiraj v vodni kopeli pri 4 različnih temperaturah (0°C, 60°C, 80°C in 100°C) 5 min, nato pa takoj prestavi na led. Ko se ohladi, izmeri A_{260} .
9. Vzorce za denaturacijo s pH inkubiraj pri sobni temperaturi vsaj 5 minut in nato izmeri A_{260} . Vzorcju v pufru s pH 7 določi tudi A_{280} .

Rezultati:

1. V tabelo vpiši vrednosti absorbanc za vse izmerjene pogoje!

pH	T (°C)	A_{260}	A_{280}
7	60		
7	80		
7	100		
7	ST		
2	ST		
4	ST		
10	ST		
14	ST		

2. Nariši odvisnost A_{260} od temperature in od pH!



Odgovori na vprašanja:

1. T_m izolirane kromosomske DNA je.....(vrednost lahko odčitaš le iz krivulje na grafu odvisnost A_{260} od temperature, kjer je prehod med nativno in denaturirano obliko DNA oster).
2. V katerem pH-območju pride do denaturacije DNA?.....
Pri tem se cepijo.....vezi.
3. A_{260}/A_{280} je....., kar pomeni, da je v vzorcu.....
4. A_{260} se pri denaturaciji nukleinskih kislin v vzorcu poveča, ker so.....
.....
5. Homogenatu goveje vranice smo pred izolacijo DNA dodali citratni pufer za preprečitev delovanja
6. Sposobnost denaturirane DNA, da ponovno tvori dvojno vijačnico, s pridom uporabljamo pri naslednjih tehnikah:
7. Če je v eni verigi dvojne vijačnice delež G 40%, v drugi pa 20%, potem je delež parov A-T.....%.