

Aprēķinu sākuma dati, saīsinājumi

1 bp (bāzu pāris) ~ 630 d (daltoni)

1 d = 1.66×10^{-24} g; Avogadro skaitlis (molekulu skaits molā vielas – 6.02×10^{23})

1 mCi (milikiri) = 37 MBk (megabekereļi)

1 Bk (bekerels) = 1 dps (radioaktīvā sabrukšana sekundē)

1 dpm (radioaktīvā sabrukšana minūtē) = 60 dps = 60 Bk

1 OD₆₀₀ naktskultūras = 5×10^8 – 1×10^9 šūnu mililitrā

1 A₂₆₀ DNS (1 cm kivetē) = 50 µg DNS/ml

Vienai elektroforētiskā kustīguma nobīdes reakcijai (EMSA) vajag ~ 2000 dpm DNS fragmenta, vienai DNāzesI protekcijas (fūtprintinga) reakcijai ~ 30000 dpm DNS.

Ar ³²P iezīmēto nukleotīdu standartfasējumi satur 250 µCi jeb 9.25 MBk radioaktivitātes 25 ml šķīduma. Īpatnējā aktivitāte parasti ir 3000 Ci/mM.

³²P pussabrukšanas periods ir 14,3 diennaktis

Uzdevumi

1) Kādām jābūt masas attiecībām starp 200 bp garu DNS fragmentu un to saistošu transkripcijas regulācijas proteīnu RafR (37 kD, dimers), ja vēlamies, lai reakcija notiktu stehiometriskos apstākļos? Cik g represora jāņem, lai tas būtu divkārsā molārā pārsvarā pār 2000 dpm EMSA reakcijā izmantota DNS preparāta, kur puse molekulu vienā galā ir iezīmētas ar radioaktīvo fosforu (3000 Ci/mM) ?

2) Kādām jābūt masas attiecībām starp 170 bp garu DNS fragmentu un to saistošu transkripcijas regulācijas proteīnu CAP (23.8 kD, dimers), ja vēlamies, lai reakcija notiktu stehiometriskos apstākļos? Cik g aktivatora jāņem, lai tas būtu piekārsā molārā pārsvarā pār 30000 dpm DNāzesI protekcijas (fūtprintinga) reakcijā izmantota DNS preparāta, kur puse molekulu vienā galā ir iezīmētas ar radioaktīvo fosforu (3000 Ci/mM) ?

)

3) Kādu maksimālo nukleīnskābē iesaistīto radioaktivitātes (dpm) daudzumu iespējams iegūt, kinējot 100 ng 200 bp gara defosforilēta fragmenta ar γ ³²P ATP, kura īpatnējā aktivitāte ir 3000 Ci/mM ? Cik µl izotopa no standartfasējuma (250 µCi jeb 9.25 MBk/ 25 µl) jāņem, lai reakcija notiktu ar 2-kāršu ATP pārsvaru ?

4) Kādu maksimālo nukleīnskābē iesaistīto radioaktivitātes (dpm) daudzumu iespējams iegūt, apstrādājot ar DNS polimerāzes I Klenova fragmentu 200 ng 150 bp gara *EcoRI* fragmenta ar α ³²P ATP, kura īpatnējā aktivitāte ir 3000 Ci/mM ? Cik µl izotopa no standartfasējuma (250 µCi jeb 9.25 MBk/ 25 µl) jāņem, lai reakcija notiktu ar 3-kāršu ATP pārsvaru ?

5) Kādu maksimālo nukleīnskābē iesaistīto radioaktivitātes (dpm) daudzumu iespējams iegūt, apstrādājot ar DNS polimerāzes I Klenova fragmentu 200 ng 250 bp gara *Bam*HI fragmenta ar $\alpha^{32}\text{P}$ dATP, kura īpatnējā aktivitāte ir 3000 Ci/mM ? Cik μl izotopa no standartfasējuma (250 μCi jeb 9.25 MBk/ 25 μl) jāņem, lai reakcija notiktu ar 3-kāršu ATP pārsvaru ? Kāds dNTP vēl jāpievieno, lai reakcija notiktu ?

6) Kādu maksimālo nukleīnskābē iesaistīto radioaktivitātes (dpm) daudzumu iespējams iegūt, apstrādājot ar DNS polimerāzes I Klenova fragmentu 200 ng 300 bp gara *Nco*I fragmenta ar $\alpha^{32}\text{P}$ dATP, kura īpatnējā aktivitāte ir 6000 Ci/mM ? Cik μl izotopa no standartfasējuma (250 μCi jeb 9.25 MBk/ 25 μl) jāņem, lai reakcija notiktu ar 3-kāršu ATP pārsvaru ? Kāds dNTP vēl jāpievieno, lai reakcija notiktu ?

7) Cik DNāzes I protekcijas reakcijām pietiks 50 ng 170 bp *Hind*III / *Pst*I fragmenta, kas iegūts iezīmējot DNS ar $\alpha^{32}\text{P}$ dATP (3000 Ci/mM) un DNS polimerāzes I Klenova fragmentu reakcijā, kuras efektivitāte ir 50 % ?

8) Cik elektroforētiskās mobilitātes nobīdes (EMSA) reakcijām pietiks 20 ng 210 bp *Eco*RI / *Pst*I fragmenta, kas iegūts iezīmējot DNS ar $\alpha^{32}\text{P}$ dATP (3000 Ci/mM) un DNS polimerāzes I Klenova fragmentu reakcijā, kuras efektivitāte ir 50 % ?

9) Cik molu un cik gramu nukleotīda satur 1 mazais fasējums (250 μCi jeb 9.25 MBk) $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP ($M_r=467$) ar īpatnējo aktivitāti 3000 Ci/mM ?

10) Kāda aptuveni ir maksimālā iespējamā $\alpha^{32}\text{P}$ iezīmētā nukleotīda īpatnējā radioaktivitāte (Ci/mM), pieņemot, ka katra molekula tiek iezīmēta ar fosfora izotopu ?

11) Cik daudz OD₆₀₀ baktēriju šūnu jāņem, lai iegūtu no tām 1 mkg 3000 bp garas pUC replikācijas tipa plazmīdas DNS?

12) Cik daudz OD₆₀₀ baktēriju šūnu jāņem, lai iegūtu no tām 1 mkg pBR322 DNS ?

13) Transformējot *E.coli* kultūru, ņem 1 μl no 10⁻⁴ atšķaidītas pUC18 (2686 bp.) plazmīdas preparāta ar koncentrāciju 1.2 μg/μl un pievieno to 100 μl kompetentu šūnu suspensijai. Transformācijas maisījumu atšķaida ar 0.9 ml barotnes, pēc tam uz antibiotiku (kādu?) saturošas plates izsēj 100 μl šūnu suspensijas. Izaug 58 kolonijas. Kāda ir transformācijas efektivitāte (plazmīdu ieguvušās šūnas / μg DNS) ? Pieņemot, ka vienas šūnas transformācija notiek uzņemot vienu plazmīdas molekulu, kāda daļa no izmantotajām plazmīdu molekulām iekļuva baktēriju šūnās ?

14) Kāda varētu būt transformācijas efektivitāte (plazmīdu ieguvušās šūnas / μg DNS) ar pUC18 DNS (2686 bp.);, ja šūnā iekļūtu 1 % no plazmīdu molekulām?

15) Cik daudz (molos un gramos) 300 bp fragmenta iespējams uzsintezēt, izmantojot PCR reakcijā praimera pārsvaru un četru dNTP maisījumu, ja 100 μl reakcijas maisījumā katra dNTP galīgā koncentrācija ir 0.2 mM ? Fragmenta GC% = 50, pieņemsim, ka 80% nukleotīdu iekļaujas DNS skābē nešķīstošajā frakcijā (fragmentā). Cik reakcijas cikli nepieciešami aprēķinātā iznākuma iegūšanai, ja reakcijas sākumā maisījumā ir divas kopijas amplificējamās sekvenses ?

)

16) Cik daudz (molos un gramos) 500 bp fragmenta iespējams uzsintezēt, izmantojot PCR reakcijā praimera pārsvaru un četru dNTP maisījumu, ja 50 μl reakcijas maisījumā katra dNTP galīgā koncentrācija ir 0.1 mM ? Fragmenta GC% = 40, pieņemsim, ka 100% nukleotīdu iekļaujas DNS skābē nešķīstošajā frakcijā (fragmentā). Cik reakcijas cikli nepieciešami aprēķinātā iznākuma iegūšanai, ja reakcijas sākumā maisījumā ir divas kopijas amplificējamās sekvenses ?

)

17) Cik daudz 25 nt. garu praimeru (molos un gramos) jāņem, lai tie vēl būtu četrkāšā pārsvarā pār reakcijas produktu pēc 35 amplifikācijas cikliem PCR reakcijā, kuru nelimitē dNTP daudzums ? Reakciju sākot maisījumā ir ~ 250 kopijas amplificējamās sekvenses. Cik g 400 bp. gara fragmenta veidosies reakcijā pēc 35 cikliem ?

18) No pUC plazmīdā klonētas DNS sekvences, kas kodē interferona proteīna priekšteča formu tālākai pārklonēšanai jāiegūst 500 bp fragments, kas kodē proteīna aktīvo formu. Ar PCR palīdzību nepieciešams iegūt 1 mg atbilstošā 500 bp fragmenta. amplificēšanai izmanto neattīrītu lizātu, kas iegūts no apm. 10^5 šūnām. Cik amplifikācijas ciklus jāveic, lai iegūtu nepieciešamo plazmīdas daudzumu? Cik molu praimera un cik molu dNTP jāpieliek reakcijas sākumā, lai reakciju beidzot praimers būtu izlietots pilnīgi, bet nukleotīdi vēl būtu divkārsā pārsvarā?

19) Lai izdalītu vienā kopijā pārstāvētu gēnu no cilvēka genoma bibliotēkas λ -fāga vektorā, ar hibridizācijas zondi primārajā skrīningā jāpārbauda apm. 10^6 fāga negatīvo koloniju, jeb 100 plates (diametrs 9 cm), vēl aptuveni 50 plates nepieciešamas fāga klona attīrīšanai. Cik g 200 bp. gara DNS fragmenta ar nejaušās praimēšanas metodi jā sagatavo kā radioaktīvo zondi izdalīšanas procesam (ar divkārsu rezervi), ja vidēji katrā zondes molekulā tiks ieslēgti 10 α ^{32}P CTP atlikumi? Cik μCi izotopa vajadzīgs zondes sagatavošanai? Hibridizācijas eksperimentiem vajag $\sim 2 \times 10^4$ dpm zondes uz 1cm^2 membrānas.

20) Pirms uzsākt klonēšanu, izmantojot pēc analogijas piemeklētu zondi, vēlams pārliecināties, vai un kādos apstākļos notiek genomiskās DNS un zondes hibridizācija gelā. Par zondi izmantosim 200 bp. garu DNS fragmentu, kurā ar nejaušās praimēšanas metodi ievadīti vidēji 10 α ^{32}P CTP atlikumi uz molekulu. Lai droši atšķirtu hibridizācijas signālu no fona, hibridizācijas zonā jābūt ap 200 dpm α ^{32}P radioaktivitātes. Zonde ar homologo secību genomiskajā DNS hibridizējas attiecībā 1 : 1. Cik g zondes jāpiesaista, lai signālu varētu atrast? Cik g genomiskās DNS no diploīdām šūnām jāuznes uz gēla, lai piesaistītu vajadzīgo zondes daudzumu, ja meklējam vienā kopijā pārstāvētu gēnu? Haploīdā genoma garums ir 3×10^9 , no cik šūnām jāizdala DNS, lai pietiktu vienam paraugam gēlā?