# Ćwiczenie III

## Analiza aktywności DNazowej metodą RED (Radial Enzyme Diffusion)

Metoda pomiaru aktywności nukleazowej RED została opisana przez (Macanovic and Lachmann, 1997). Oznaczenie aktywności DNazowej w tej metodzie możliwe jest dzięki naniesieniu próbek z DNazą na 1% żel agarozowy w buforze zapewniającym optymalną aktywność DNazy zawierającym DNA (substrat) oraz fuorescencyjny barwnik umożliwiający detekcję DNA w świetle UV. W efekcie dyfuzji DNazy do żelu wokół studzienek, dochodzi do hydrolizy znajdującego się w nim DNA, co jest widoczne w świetle UV w formie ciemnych plam.

### Przygotowanie żelu agarozowego w buforze H i pomiar RED

1. Wyjmujemy próby z -80 °C I pozostawiamy w lodówce do rozmarznięcia
2. W falkonie na 15 ml przygotowujemy 1% żel agarozowy (wspólny dla całej grupy ćwiczeniowej) do pomiaru aktywności nukleazowej.

 Agarozę odważamy i zalewamy odpowiednią objętością buforu H (25mM Hepes, 4mM CaCl2, 4mM MgCl2, 0,05% Tween, pH 7,5).

Uwaga: Objętość buforu trzeba przeliczyć względem powierzchni, na którą będziemy go wylewać tak, aby po wylaniu żelu otrzymać warstwę o grubości < 1mm.

1. Agarozę w buforze H ostrożnie podgrzewamy w kuchence mikrofalowej, aż do jej całkowitego rozpuszczenia
2. Po schłodzeniu mieszanki do temperatury ~60°C dodajemy Midori Green (stężenie końcowe powinno wynosić 1:2000 v/v) oraz roztwór DNA (stężenie końcowe powinno wynosić 0,1 mg/ml) i mieszamy delikatnie przez odwrócenie zamkniętego falkonu.
3. Żel wylewamy na czyste odtłuszczone za pomocą alkoholu saneczki do elektroforezy i równomiernie rozprowadzamy po całej powierzchni saneczek. Pozostawiamy do zastygnięcia.
4. Na kartce w kratkę przyciętej do rozmiaru żelu agarozowego przygotowujemy szablon zgodnie, z którym zostaną wycięte w żelu studzienki i nałożone poszczególne próby. Podczas planowania rozmieszczenia prób na żelu należy pamiętać również o krzywej kalibracyjnej
5. Po podłożeniu szablonu pod zastygnięty żel wycinamy w nim studzienki za pomocą przyciętego tipsa (studzienka powinna mieć średnicę ~2mm).
6. Rozmrożone próby „vorteksujemy” a następnie wirujemy 10 min przy 13000 rpm w 4 °C. Po zwirowaniu, próby trzymamy w zimnym bloku
7. Z każdej próby pobieramy po 3 µl ekstraktu i nanosimy do studzienek na żelu. Do dolnych studzienek nanosimy kolejne rozcieńczenia aktywnej DNazy I (krzywa kalibracyjna)

1000U 100U 10U 5U 2U 1U

Uwaga: Na czas nanoszenia prób na żel saneczki powinny być umieszczone na lodzie (lub próby powinny być nakładane w chłodni)

1. Żel przykrywamy folią w celu ograniczenia parowania
2. Inkubujemy 1 h w 37°C

Uwaga: w czasie inkubacji wykonujemy zadania z punktów 14-19

1. Detekcję aktywności DNazowej dokonujemy w świetle UV. Mierzymy średnicę wytrawionych przez DNazę radialnych przejaśnień wokół studzienek zawierających poszczególne próby i porównujemy aktywność z krzywą wzorcową. Przyjmuje się, że aktywność DNazowa jest wprost proporcjonalna do średnicy obszaru, w którym doszło do hydrolizy DNA. Oszacowaną aktywność DNazową przeliczamy na TSP

### Pomiar TSP (total soluble protein) metodą Bradford

1. Rozmrożone próby „vorteksujemy” a następnie wirujemy 10 min przy 13000 rpm w 4 °C
2. Po zwirowaniu prób trzymamy je w zimnym bloku
3. Pobieramy 3x3 µl z każdej próby i przenosimy do studzienek płytki titracyjnej (kolejno wszystkie próby z grupy ćwiczeniowej)
4. Do 3 pierwszych kolumn (ABC) nanosimy kolejno 3 µlx3 (po 3 powtórzenia) rozcieńczeń roztworu BSA w 50 mM Tris, pH 7.5 w celu sporządzenia krzywej (kolejne rozcieńczenia BSA:

1 0,75 0,5 0,25 0,1 0,075 0,025 0,01 mg/ml

1. Do studzienek zawierających próby oraz rozcieńczenia BSA dodajemy po 50 ml rozcieńczonego odczynnika Bradford a następnie wykonujemy pomiar przy 595 nm w Varioscanie
2. Wykonujemy krzywą kalibracyjną i na tej podstawie liczymy stężenie białka rozpuszczalnego w próbach
3. Aktywność nukleazową prób odczytaną z żelu przeliczamy na stężenie TSP (wracamy do pkt. 12)