

# 13. WŁASNOŚCI I SKŁAD Kwasów NUKLEINOWYCH

## 1. Preparatyka kwasów nukleinowych z drożdży

### Zasada:

W komórce – zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie – większość kwasów nukleinowych występuje w formie nukleoprotein. Izolowanie takich połączeń wymaga zastosowania łagodnej procedury ekstrakcyjnej, ponieważ pod wpływem stężonych soli nukleoproteiny dysocjują na kwas nukleinowy i białka. Opisana poniżej preparatyka kwasów nukleinowych z drożdży polega na rozbiciu komórek oraz usunięciu białek z ekstraktu za pomocą anionowego detergentu siarczanu dodecylu sodu (SDS), który jednocześnie hamuje aktywność rybonukleaz (dzięki denaturacji białek). Kwasy nukleinowe wytrąca się z ekstraktu za pomocą etanolu. W komórkach drożdży większość kwasów nukleinowych stanowią kwasy rybonukleinowe, natomiast DNA nie osiąga 2% całkowitej zawartości kwasów nukleinowych. Zastosowana metoda ekstrakcji kwasów nukleinowych z tego materiału biologicznego (drożdży) pozwala otrzymać preparaty, które przede wszystkim zawierają RNA o wysokiej masie cząsteczkowej. Preparaty te charakteryzują się niską zawartością DNA (około 0,5%) oraz stosunkowo niskim stopniem zanieczyszczenia białkami (do 2% preparatu).

### Wykonanie:

- W zlewce ogrzać do wrzenia 55 ml 6% roztworu SDS na płytce elektrycznej, stale mieszając. Dodać 25 g rozdrobnionych drożdży piekarskich i dalej ogrzewać przez 1 minutę. Przenieść zlewkę z ekstraktem z płytki elektrycznej do wrzącej łaźni wodnej i ogrzewać następne 2 minuty, stale mieszając. Ekstrakt schłodzić do temperatury 4<sup>0</sup>C, po czym wirować przy 3000 obr./min przez 10 minut w wirówce laboratoryjnej.
- Supernatant (płyn nad osadu) zlać do cylindra miarowego, zmierzyć objętość, po czym wlać do dwóch objętości oziębionego w lodzie 95% etanolu. Po upływie 5 minut odwirować osad wytrąconego kwasu nukleinowego, w warunkach opisanych powyżej. Osad rozpuścić w 10 ml 0,1 M NaOH. Roztwór nukleinianu zachować do następnych ćwiczeń.

## 2. Rozpuszczalność kwasów nukleinowych

### Zasada:

Kwasy nukleinowe mają charakter polianionowy, wynikający z bogactwa reszt fosforanowych w ich strukturze, dzięki którym mają odczyn kwasowy. Dlatego wolne kwasy nukleinowe dobrze rozpuszczają się w roztworach zasadowych, natomiast słabo w rozcieńczonych kwasach i w wodzie. Kwasy nukleinowe w wodnych roztworach tworzą koloidy, z których łatwo można je wytrącić odczynnikami odwadniającymi, np. etanolem, który jest powszechnie wykorzystywany w metodach izolacyjnych do oczyszczania kwasów nukleinowych.

### Wykonanie:

- Do 0,5 ml roztworu 0,1% nukleinianu dodawać kroplami 0,1 M HCl aż do wytrącenia osadu kwasu nukleinowego. Następnie dodać kroplami 1 M NaOH, aż do ponownego rozpuszczenia osadu.
- Do 0,5 ml roztworu nukleinianu dodać 1 ml 95% etanolu. Zaobserwować wytrącanie się osadu kwasu nukleinowego.

## 3. Hydroliza kwasowa RNA

### Zasada:

Wykrywanie obecności kwasów nukleinowych w materiale biologicznym opiera się na ich wielkocząsteczkowym charakterze, charakterystycznych własnościach absorbowania światła UV oraz na analizie jakościowej składu kwasów nukleinowych. Większość charakterystycznych reakcji dla poszczególnych składników kwasów nukleinowych, zachodzi dopiero po hydrolizie makrocząsteczki na składniki proste. W tym celu należy przeprowadzić hydrolizę chemiczną kwasu nukleinowego. DNA jest odporne na działanie mocnych zasad, pozostawiony w roztworze 1M NaOH przez 20–40 godz. w temp. 37°C nie dostarcza żadnych produktów hydrolizy zasadowej. W tych warunkach RNA rozpada się całkowicie do mieszaniny 2'- i 3'-monofosfonukleozydów. Możliwe jest to dzięki obecności grupy –OH przy atomie C2' rybozy, która w środowisku zasadowym uczestniczy w tworzeniu nietrwałych cyklicznych nukleozydo-2',3'-fosforanów, rozpadających się z równym prawdopodobieństwem do nukleozydo-2'- i nukleozydo-3'-fosforanów. Brak grupy –OH przy atomie C2' deoksyrybozy uniemożliwia powstanie cyklicznych fosforanów nukleozydów podczas hydrolizy zasadowej DNA i jest to przyczyną oporności kwasów deoksyrybonukleinowych na działanie zasad, dlatego DNA hydrolizuje się w środowisku kwasowym. Hydroliza kwasowa kwasów nukleinowych dostarcza różnych pro-

duktów zależnie od stężenia stosowanych kwasów, czasu trwania hydrolizy i temperatury. Wiązania glikozydowe różnią się wrażliwością na działanie kwasów, tzn. w nukleotydach purynowych wiązania glikozydowe są bardziej labilne niż w nukleotydach pirymidynowych. Dlatego krótkotrwałe ogrzewanie (w 100°C), zarówno DNA, jak i RNA z kwasami (np. HCl) o małych stężeniach (ok. 1 M) dostarcza początkowo kwasów apurynowych, które są łańcuchami polinukleotydowymi, pozbawionymi zasad purynowych, a dopiero w dalszym etapie hydrolizy (po 1 godz.) dostarcza mononukleotydów pirymidynowych, pentoz i kwasu fosforowego. Natomiast pod działaniem mocnych kwasów mineralnych (np. 72% roztwór HClO<sub>4</sub>) i w podwyższonej temperaturze (100°C przez 1 godz.) z obu typów kwasów nukleinowych następuje uwolnienie zasad purynowych i pirymidynowych, pentoz i kwasu fosforowego.

#### **Wykonanie:**

- Do probówki odmierzyć 5 ml nukleinianu z drożdży, dodać 10 ml 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 45 minut. Otrzymany hydrolizat zachować do następnych ćwiczeń.

### **3.1. Wykazanie obecności puryn**

#### **Zasada:**

Zasady azotowe reagują z jonami Ag<sup>+</sup> (lub Cu<sup>+</sup>), tworząc nierozpuszczalne sole kompleksowe.

#### **Wykonanie:**

- Do 1 ml hydrolizatu nukleinianu dodać stężonego amoniaku do odczynu lekko alkalicznego, ocenionego papierkiem wskaźnikowym. Roztwór przesączyć, jeśli nie jest klarowny. Do klarownego przesącza dodać 0,3 ml 1% roztworu AgNO<sub>3</sub>. Wytrąca się osad soli srebrowych puryn nierozpuszczalnych w amoniaku.

### **3.2. Wykazanie obecności kwasu fosforowego**

#### **Zasada:**

Kwas fosforowy reaguje z molibdenianem amonu w obecności HNO<sub>3</sub>, w wyniku czego powstaje nierozpuszczalny fosfomolibdenian amonu, żółto zabarwiony osad.

### Wykonanie:

- Do 0,5 ml hydrolizatu nukleinianu dodać stężonego amoniaku do odczynu obojętnego, ocenionego papierkiem wskaźnikowym. Następnie dodać 0,5 ml stężonego  $\text{HNO}_3$ , po czym 2 ml 5% roztworu molibdenianu amonu. Probówkę z próbą wstawić do wrzącej łaźni wodnej i ogrzać do wrzenia. Podczas ogrzewania pojawia się żółty fosfomolibdenian amonu, co jest dowodem, że w hydrolizacie był kwas fosforowy.

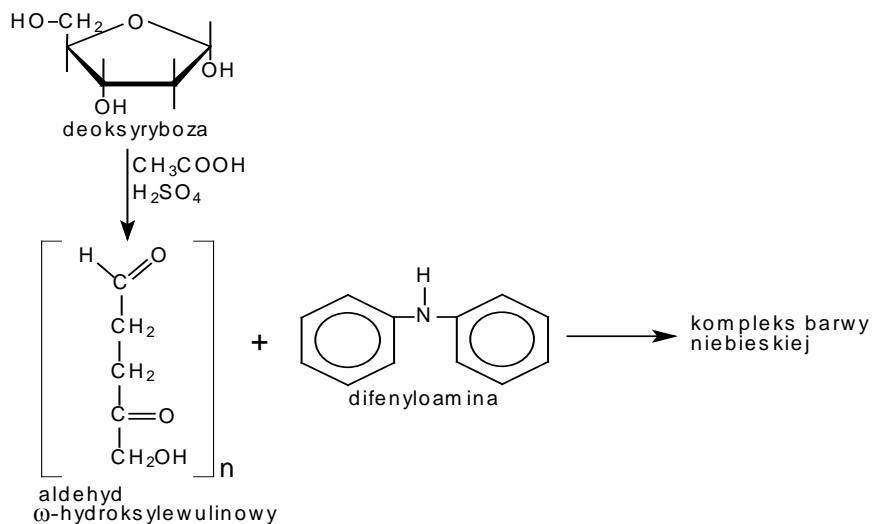
## 4. Odróżnianie DNA od RNA

Nukleotydy budujące DNA zawierają 2'-deoksy-D-rybozę, a RNA D-rybozę. Istnienie różnych pentoz jest podstawą chemicznego odróżniania preparatu DNA od RNA.

### 4.1. Wykrywanie DNA metodą Dischego

#### Zasada:

W środowisku kwaśnym (stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) deoksyryboza (wolna i związana w nukleotydach purynowych) tworzy z difenylaminą produkt kondensacji o barwie niebieskiej. Ta barwna reakcja jest konsekwencją powstania aldehydu hydroksylewulinowego z deoksyrybozy pod wpływem działania kwasu siarkowego i octowego.



Następnie aldehyd ten kondensuje z difenylaminą, tworząc produkt o barwie niebieskiej, którego maksimum absorpcji przypada przy długości fali 600 nm. Oprócz deoksyrybozy reakcję tę daje także kwas N-acetylneuraminowy. Powstały produkt w środowisku obojętnym lub zasadowym ma barwę żółtą. Deoksyryboza związana z zasadami pirymidynowymi i ryboza nie dają tego odczynu.

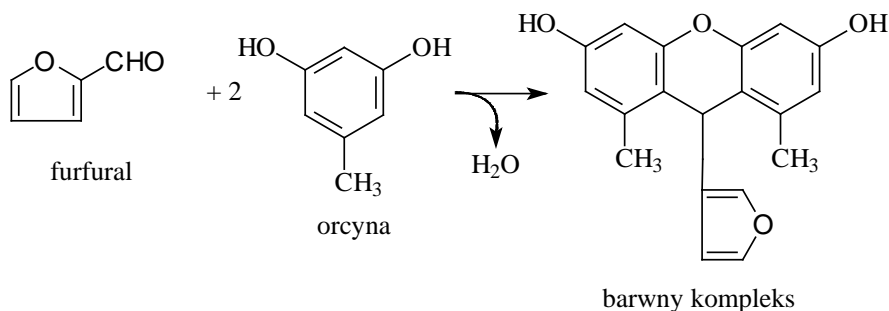
#### Wykonanie:

- Przygotować w statywie 4 probówki. Do każdej z nich odmierzyć po 0,5 ml roztworów, odpowiednio: kwasu nukleinowego nr 1 do pierwszej, kwasu nukleinowego nr 2 do drugiej, deoksyrybozy do trzeciej i wody destylowanej do czwartej (próbna ślepa).
- Do wszystkich probówek wprowadzić po 1 ml odczynnika Dischego (1% difenylamina w  $H_2SO_4$  i  $CH_3COOH$  lodowaty) i wymieszać.
- Probówki z analizowanymi próbkami wstawić do wrzącej łaźni wodnej i ogrzewać przez 10 minut.
- Zinterpretować uzyskane wyniki, wyjaśnić, która próbna kwasu nukleinowego jest roztworem DNA.

#### 4.2. Wykrywanie RNA metodą orcynową

##### Zasada:

Wolne pentozy, fosfopentozy, jak też związane w nukleotydach purynowych (lecz nie pirymidynowych) w kwasach nukleinowych podczas ogrzewania ze stężonym HCl przechodzą w furfural.



Powstały furfural tworzy z orcyną, w obecności katalitycznie działających jonów  $Fe^{+3}$ , kompleks o trwałej barwie zielonej, którego maksimum absorpcji przypada przy długości fali 610 nm. W tych warunkach deoksyryboza reaguje 10-krotnie słabiej od rybozy, dlatego odczyn ten dla DNA wypada ujemnie. Re-

akcji tej nie daje ryboza związana z zasadami pirymidynowymi lub amidem kwasu nikotynowego.

#### **Wykonanie:**

- Przygotować w statywie 4 probówki. Do każdej z nich odmierzyć po 0,5 ml roztworów, odpowiednio: kwasu nukleinowego nr 1 do pierwszej, kwasu nukleinowego nr 2 do drugiej, rybozy do trzeciej i wody destylowanej do czwartej (próba ślepa).
- Do wszystkich probówek wprowadzić po 5 kropli 10% roztworu orcyiny w etanolu i następnie po 1 ml 0,1%  $\text{FeCl}_3$  w stężonym HCl.
- Wszystkie próby wymieszać. Probówki z analizowanymi próbkami wstawić do wrzącej łaźni wodnej i ogrzewać do pojawienia się barwy zielonej.
- Zinterpretować uzyskane wyniki. Wyjaśnić, która próba kwasu nukleinowego jest roztworem RNA.

## **5. Spektrofotometria nukleotydów i kwasów nukleinowych**

#### **Zasada:**

Kwasy nukleinowe, nukleotydy, nukleozydy i zasady azotowe selektywnie pochłaniają światło w nadfiolecie (UV) z maksimum przypadającym na 260 nm. Zjawisko to znalazło zastosowanie w analizie chemicznej. Właściwość ta wynika z obecności w omawianych związkach układów purynowego lub pirymidynowego, zawierających sprzężone wiązania podwójne. Na intensywność i charakter pochłaniania światła nie mają wpływu obecne reszty monocukrowe oraz grupy fosforanowe, dlatego widma absorpcji zasad azotowych i odpowiadających im nukleotydów są bardzo podobne. Absorbancja DNA nie jest addytywną sumą absorbancji wszystkich zasad azotowych wchodzących w jego skład, rzeczywista molowa absorpcja jest niższa o około 40% od wartości teoretycznie obliczonej na podstawie składu. Zjawisko to nosi nazwę efektu hipochromowego, który związany jest z helikalnym uporządkowaniem przestrzennym obu nici polinukleotydowych, opisanym strukturą drugorzędową i trzeciorzędową DNA. Preparaty kwasów nukleinowych mogą być zanieczyszczone białkami, których maksimum pochłaniania światła przypada w paśmie 280 nm. Własności spektroskopowe makrocząsteczek pozwalają określić przybliżoną czystość preparatów kwasów nukleinowych, na podstawie wartości stosunku absorbancji przy 260 nm i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Wolny od zanieczyszczeń dwuniciowy DNA ma wartość współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  równą 1,8, czysty RNA około 2, czyste białka poniżej 1 (około 0,5). Preparat DNA, którego wartość współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  jest większa od wartości 1,8, może być zanieczyszczony RNA, gdy współczyn-

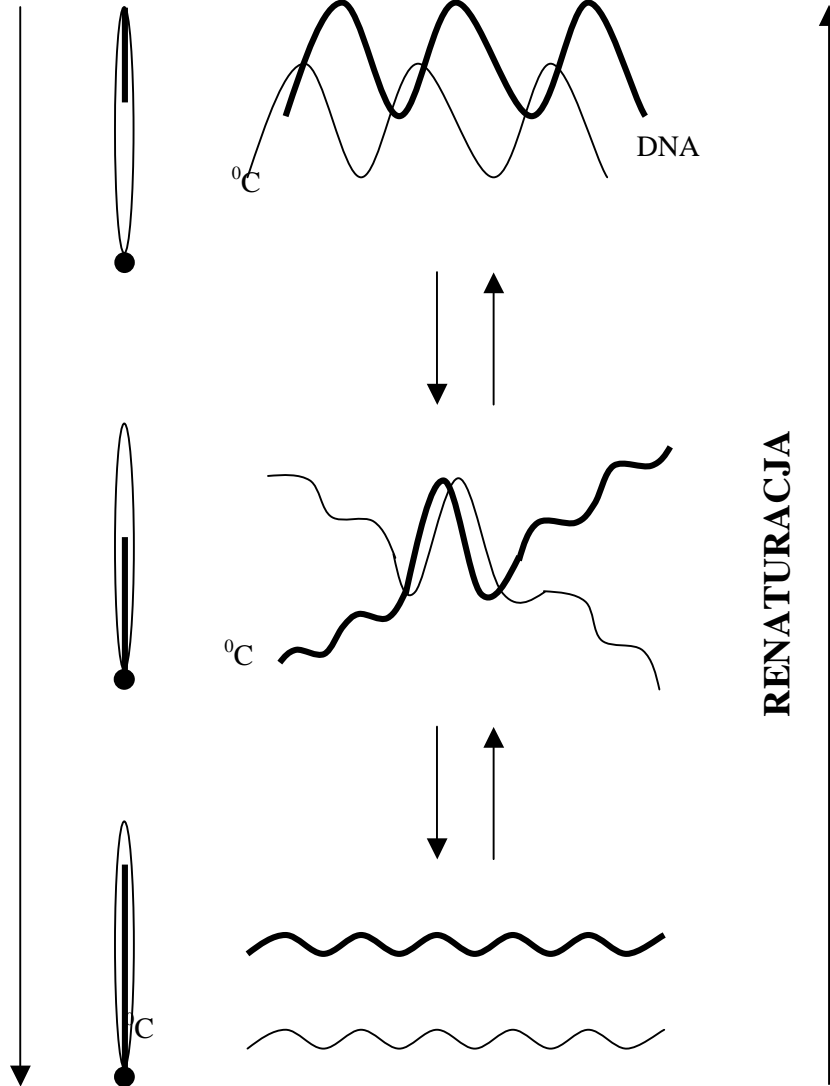
nik  $A_{260}/A_{280}$  ma wartość poniżej 1.8, to preparat zanieczyszczony może być białkami.

## 5.1. Denaturacja i renaturacja DNA

Zniszczenie struktury II- i III-rzędowej DNA nosi nazwę denaturacji. Procesowi temu towarzyszy zwiększenie pochłaniania światła w nadfiolecie – czyli efekt hiperchromowy. Wielkość efektu hiperchromowego jest proporcjonalna do ilości nukleotydów znajdujących się w helikalnych fragmentach cząsteczki. Czynniki denaturującymi DNA są: wysoka temperatura, wysokie stężenie jonów wodorowych, alkohole, fenole, ultradźwięki, promieniowanie. Pod wpływem ogrzewania struktura podwójnej helisy DNA ulega zniszczeniu i rozpada się na pojedyncze nici. Temperaturą topnienia określonego preparatu DNA nazywamy taką, w której dochodzi do utraty połowy helikalnej struktury DNA. Wartość temperatury topnienia jest zależna od składu zasadowego DNA (im wyższa zawartość par CG, tym wyższa temperatura topnienia). Denaturacja jest odwracalna. Po usunięciu czynnika denaturującego następuje odtworzenie komplementarnej struktury podwójnej helisy DNA. Proces ten nazywa się **renaturacją**. Denaturacji DNA towarzyszą zmiany własności fizycznych, jak lepkość, skręcalność optyczna oraz absorpcja światła w ultrafiolecie, która sprowadza się do efektu hiperchromowego. Zdenaturowany DNA (w temperaturze nieco niższej od temperatury topnienia) ulega prawie całkowitej renaturacji do struktury dwuniciowej podczas powolnego schładzania w temperaturze pokojowej. Renaturacja powoduje, że efekt hiperchromowy jest niemal całkowicie cofnięty, dzięki towarzyszącemu efektowi hipochromowemu. Denaturacja DNA (w temperaturze wyższej od temperatury topnienia) sprawia, że po ochłodzeniu roztworu DNA efekt hiperchromowy nie jest całkowicie niwelowany. Szybkość renaturacji wyraża się jako iloczyn stężenia (mol/l) i czasu (s). Przykładowo, u prokariota renaturacja zazwyczaj jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości genomu. Szybkość renaturacji DNA jest tym większa, im wyższa jest zawartość powtarzających się sekwencji w DNA. Przykładowo, mysiego DNA (10% mysiego DNA) renaturuje w ciągu kilku sekund, znacznie szybciej od najmniejszych cząsteczek DNA (np. faga T<sub>4</sub>, lub *E.coli*). Natomiast DNA zawierający sekwencje unikatowe, nie powtarzające się (70% mysiego DNA) renaturuje bardzo wolno.

Łączenie w podwójne helisy podczas renaturacji pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych, pochodzących z różnych kwasów nukleinowych (zarówno typu DNA-DNA, jak i DNA-RNA) nazywa się **hybrydyzacją**. Tworzenie hybryd jest tym skuteczniejsze, im łańcuchy zawierają więcej sekwencji komplementarnych. Hybrydyzacja jest ważną metodą biologii molekularnej.

DENATURACJA





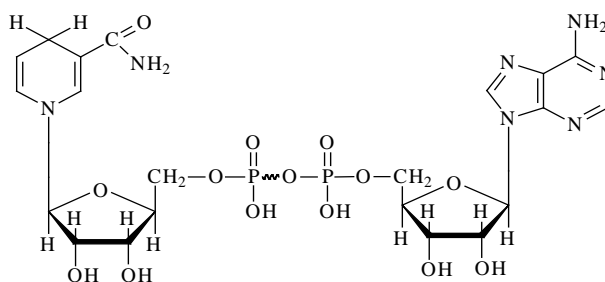
### Wykonanie:

- Wykreślić widmo absorpcji wodnego roztworu natywnego DNA wobec wody destylowanej w zakresie światła UV, od 230 do 330 nm w aparacie Specord UV/VIS.
  - Roztwór natywnego DNA przelać do probówki, wstawić do wrzącej łąźni wodnej i denaturować przez 5 minut, po czym natychmiast wlać do kувety i wykreślić widmo absorpcji zdenaturowanego DNA wobec wody destylowanej, jak wyżej.
- Zdenaturowany DNA pozostawić w probówce w temperaturze pokojowej na 30 minut w celu renaturacji. Po tym czasie wykreślić widmo absorpcji zrenaturowanego DNA, zgodnie z postępowaniem opisanym wcześniej.
- Porównać uzyskane widma absorpcyjne.

## 5.2. Spektrofotometryczne rozróżnianie $\text{NADH} + \text{H}^+$ od $\text{NAD}$

### Zasada:

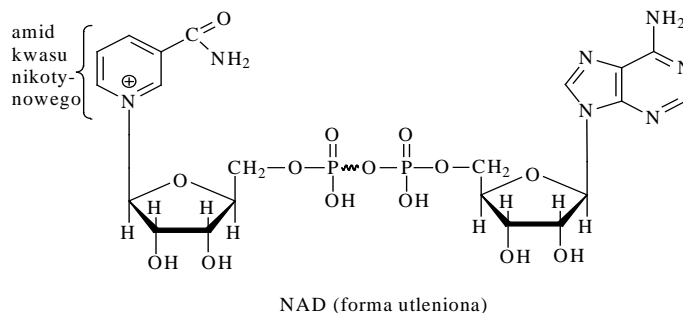
Dinukleotyd nikotynamidoadeninowy jest koenzymem dehydrogenaz, może występować w formie utlenionej lub – gdy przyjmie jeden proton i dwa elektrony (do pierścienia amidu kwasu nikotynowego) – przechodzi w formę zredukowaną. Obie formy, utleniona ( $\text{NAD}$ ) i zredukowana ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ), wykazują maksimum absorpcji przy 260 nm, natomiast forma zredukowana posiada dodatkowe pasmo absorpcyjne przy 340 nm.



$\text{NADH} + \text{H}^+$  (forma zredukowana)

Ilościowe zmiany jednej z form koenzymu, śledzone poprzez spektrofotometryczne pomiary, np. spadku absorbancji przy 340 nm, mogą odzwierciedlać szybkość reakcji enzymatycznej. Przykładem może być, tworzenie mleczanu

i NAD w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową, której  $\text{NADH}+\text{H}^+$  jest koenzymem.



### Wykonanie:

- Wykreślić widma absorpcji obu form NAD (1 i 2) wobec wody destylowanej w zakresie światła UV 240–400 nm w aparacie Specord UV/VIS. Zinterpretować otrzymane widma absorpcyjne i wskazać, który preparat zawiera zredukowaną formę tego koenzymu  $\text{NADH}+\text{H}^+$ .

### ODCZYNNIKI

6% roztwór SDS; drożdże piekarskie; 95% etanol; 0,1 M roztwór NaOH; 0,1% RNA; 0,1% DNA; 0,1 M roztwór HCl; 1 M roztwór NaOH; 10% roztwór  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{NH}_3$  stężony; papierki wskaźnikowe; 1% roztwór  $\text{AgNO}_3$ ;  $\text{HNO}_3$  stężony; 5% roztwór  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (5 g molibdenianu amonu rozpuścić w 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , po czym wlać do 50 ml  $\text{HNO}_3$  o ciężarze wł. 1,2); 0,1% roztwór deoksyrybozy; 0,1% roztwór rybozy; odczynnik Dischego (1 g difenylaminy, 2,75 ml stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  uzupełnić do 100 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  lodowatym – odczynnik nie może mieć zabarwienia niebieskiego); 10% roztwór orcyny w etanolu 95%; 0,1%  $\text{FeCl}_3$  w stężonym HCl; roztwór  $\text{NAD}^+$  (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); roztwór  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### NOTATKI