



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny

BIOCHEMIA



Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych
Materiałów Opakowaniowych**

ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin



Kwasy nukleinowe.

**Izolacja oraz badanie właściwości
fizycznych i chemicznych**

Ćwiczenie 10

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA)

Ćwiczenie 11

Kwas rybonukleinowy (RNA)

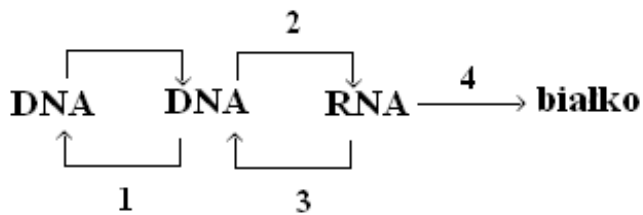
Kwasy nukleinowe – wprowadzenie

Organizmy żywe są mogą istnieć wyłącznie wtedy, gdy są zdolne przekazać swą informację genetyczną organizmom potomnym. Podstawę tej informacji genetycznej stanowi kwas deoksyrybonukleinowy i następujący kierunek przekazywania:

DNA → RNA → białka → komórka → organizm

Rys. Kłyszajko-Stefanowicz

Schemat przepływu informacji genetycznej przedstawiony poniżej określany jest jako centralny dogmat biologii molekularnej (ekspresja genów):



Rys. Kłyszajko-Stefanowicz

Synteza potomnej cząsteczki DNA to **replikacja (etap 1)** na schemacie), przekazywanie informacji z DNA na RNA to **transkrypcja (etap 2)**, a z RNA dla syntezy białka – **translacja (etap 4)**. Ten ostatni termin jest związany z przetłumaczeniem informacji zapisanej w sekwencji nukleotydów na „język aminokwasów”. Istnieje możliwość przekazywania informacji z RNA na DNA, tj. **odwrotna transkrypcja (etap 3)**.

Budowa i właściwości kwasów nukleinowych; struktura i organizacja chromatyny

elementy składowe kwasów nukleinowych – zasady azotowe, nukleozydy i nukleotydy

Cząsteczki nazywane kwasami nukleinowymi biorą swoją nazwę od głównego miejsca występowania w komórce – jądra (łac. nucleus). Wyróżnia się dwa rodzaje kwasów nukleinowych – kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid – RNA) oraz deoksyrybonukleinowy (ang. desoxiribonucleic acid – DNA). W budowie obydwu z nich dostrzec można tak podobieństwa, jak i różnice. Różnią się one ponadto funkcją i lokalizacją komórkową: DNA występuje w jądrze i stanowi magazyn informacji genetycznej, zaś RNA obecny jest w jądrze i w cytoplazmie, a jego podstawową rolą jest udział w biosyntezie białek. Wszystkie kwasy nukleinowe są polimerami mniejszych cząsteczek, zwanych nukleotydami. Nukleotyd składa się z nukleozydu, do którego przyłączona jest reszta fosforanowa (PO_4^{3-}). Nukleozyd z kolei stanowi połączenie zasady azotowej oraz cukru pięciowęglowego (pentozy)

- **zasady azotowe**

Zasady azotowe wchodzące w skład kwasów nukleinowych to pochodne puryny (zasady purynowe) lub pirymidyny (zasady pirymidynowe). Zasady purynowe to adenina (A; 6-aminopuryna) i guanina (G; 2-amino-6-hydrokypuryna), zaś pirymidynowe – cytozyna (C; 2-hydroksy-4-aminopirymidyna), uracyl (U; 2,4-dihydroksypirymidyna) i tymina (T; 5-metylouracyl). Adenina, guanina i cytozyna występują w obu rodzajach kwasów nukleinowych, natomiast tymina tylko w DNA, a uracyl – tylko w RNA.

- **pentozy, nukleozydy**

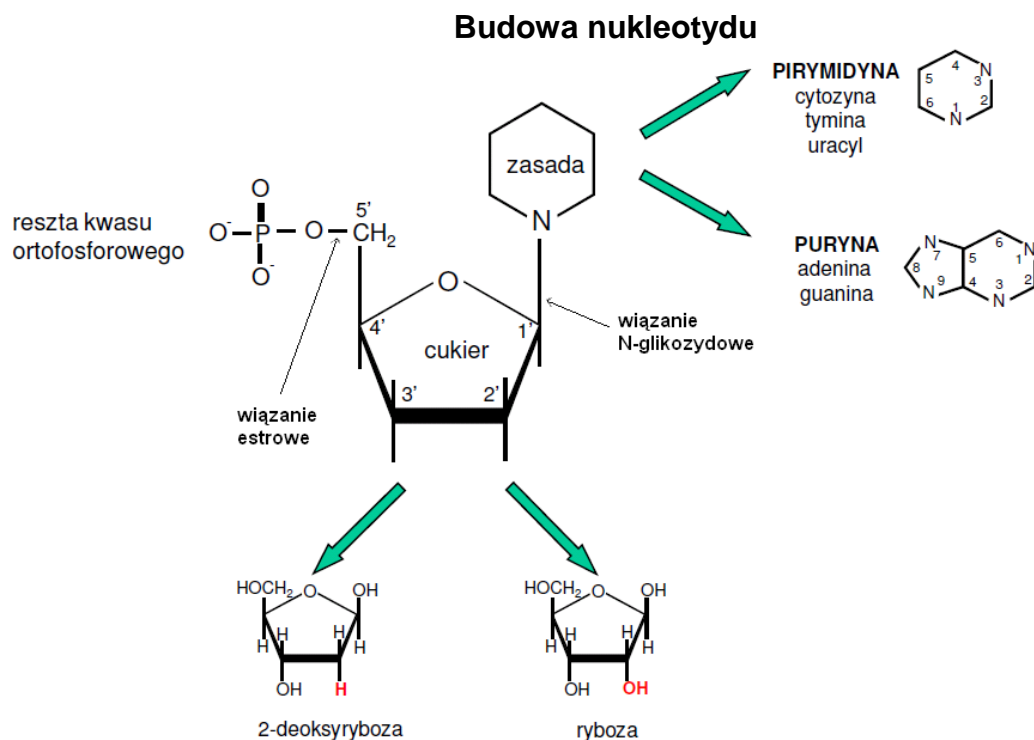
Drugim składnikiem nukleozydu jest cukier C5 – pentoza. Nazwy kwasów nukleinowych wzięły się właśnie od wchodzących w ich skład cukrów – kwas rybonukleinowy zawiera D-rybozę, zaś deoksyrybonukleinowy – 2-deoksy-D-rybozę. Obie pentozy występują w kwasach nukleinowych w postaciach pierścieniowych (β -furanozowych). Atomy węgla wchodzące w skład pierścienia pentozy numeruje się, dodając znaczek ' (prim), dla odróżnienia od numeracji atomów zasad azotowych. Nukleozydy są N-glikozydami pentoz zasad azotowych, przy czym wiązanie glikozydowe łączy atom C1' pierścienia cukrowego z atomem N1 zasady pirymidynowej lub N9 zasady purynowej.

Nazwy nukleozydów tworzone są od występujących w nich zasad. W nukleozydach purynowych końcówkę zasady –ina zamienia się na –ozyna: nukleozyd adeniny (9-N- β -D-rybofuranozyloadenina) to adenozyzna, a guaniny (9-N- β -D-rybofuranozyloguanina) – guanozyzna. Nazwy nukleozydów pirymidyn tworzy się w inny sposób: nukleozyd uracylu (1-N- β -D-rybofuranozylouracyl) to urydyna, cytozyny (1-N- β -D-rybofuranozylocytozyna) – cytydyna, zaś tyminy (1-N-2'-deoksy- β -D-rybofuranozylotymina) – tymidyna (występuje tylko w DNA i zawsze zawiera deoksyrybozę).

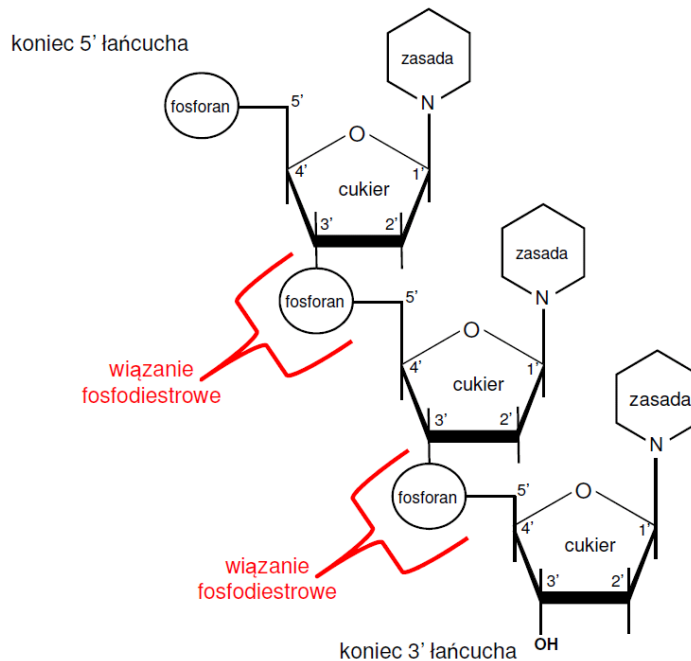
Nukleozydy zawierające rybozę określa się jak rybozydy, a deoksyrybozę – deoksyrybozydy.

- **nukleotydy**

Nukleotydy są estrami fosforowymi (dokładnie – ortofosforowymi (V)) nukleozydów. Reszta fosforanowa związana jest z jedną z grup hydroksylowych pentozy: w rybozydach – przy C2', C3' lub C5', a deoksyrybozydach – przy C3' lub C5'.



Fragment łańcucha kwasu nukleinowego



Budowa przestrzenna i właściwości DNA

Badacze J. D. Watson i F. C. K. Crick wykazali, że DNA posiada strukturę II-rzędową w postaci podwójnej prawoskrętnej helisy. Dwie nici polinukleotydowe występują jako wzajemnie splecione helisy, oplatające linię śrubową wspólną oś długą (forma B, konformacja B).

W zależności od warunków środowiska, dwupasmowe DNA może występować w co najmniej 6 formach: A, B, C, D, E i Z, przy czym w warunkach fizjologicznych (niskie stężenia soli, wysoki poziom uwodnienia) dominuje forma B.

- Każda z nici DNA ma na jednym końcu (oznaczanym jako koniec 5'), przy ostatnim nukleotydzie wolną grupę fosforanową przy węglu 5' deoksyrybozy, a na drugim końcu (oznaczanym jako koniec 3') ostatni nukleotyd posiada wolną grupę hydroksylową przy węglu 3' deoksyrybozy. Ze względu na to, że helisa dwóch nici DNA jest spleciona w ten sposób, że jedna z nici zaczyna się od końca 5' a druga od końca 3', mówi się, że obie nici są względem siebie antyrównoległe.
- Grupy cukrowe i fosforanowe stanowią zewnętrzny szkielet, wijący się helikalnie, natomiast zasady schowane są we wnętrzu cząsteczki, co chroni informację genetyczną i umożliwia oddziaływania między zasadami. Każda zasada jednego łańcucha jest bowiem połączona wiązaniami wodorowymi z naprzeciw leżącą zasadą drugiego łańcucha (para A·T wytwarza 2 wiązania wodorowe a para G·C wytwarza 3 wiązania). Ponieważ odległość między nimi jest stała, a wymiary zasad purynowych i pirymidynowych – różne, toteż wnioskować można, że wiązania tworzą się między zasadą purynową jednego łańcucha a pirymidynową drugiego.

- Replikacja DNA to proces, w którym podwójna nić DNA ulega skopiowaniu. Biosynteza DNA odbywa się według modelu semikonserwatywnego tzn. jego powielenie dokonuje się przez rozplecenie podwójnego heliksu na dwie nici i dobudowanie do każdej z nich nowej - w każdej z dwóch uzyskanych podwójnych nici DNA będzie jedna nić macierzysta i jedna nowa. Replikacja musi poprzedzać podział komórki, w celu wyposażenia komórek potomnych w kompletny, a więc zawierający wszystkie potrzebne informacje, materiał genetyczny)

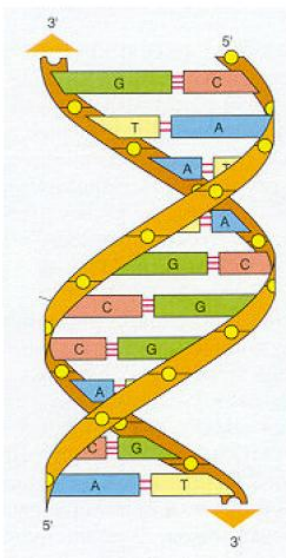
Skład nukleotydowy DNA dwuniciowego wykazuje charakterystyczne cechy. Chargaff w latach 50. wykazał po raz pierwszy, że istnieją pewne reguły w składzie nukleotydowym DNA, niezależnie od jego pochodzenia. Odegrały one wielką rolę w opracowaniu modelu struktury DNA. Są to tzw. reguły Chargaff'a:

- 1) Suma zasad purynowych równa się sumie zasad w DNA równa się sumie zasad pirymidynowych ($A+G = C+T$),
- 2) Suma zasad z grupą 6-aminową (A) i 4-aminową (C) jest równa sumie zasad z grupą ketonową (G+T) w tych pozycjach,
- 3) Ilość adeniny jest równa ilości tyminy ($A = T$),
- 4) Ilość guaniny jest równa ilości cytozyny ($G = C$).

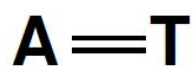
Wśród DNA wyróżnia się typ AT, z przewagą par A·T i typ GC z przewagą par G·C (kwasów typu GC jest zdecydowanie mniej).

Udział par zasad G·C jest charakterystyczny dla DNA różnego pochodzenia. Na ogół w DNA ssaków waha się około 40-43%, a więc kwas należy do typu AT. Najistotniejszą cechą DNA z różnych źródeł jest nie skład zasad, a kolejność nukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym, tj. sekwencja nukleotydowa. Jest ona charakterystyczna gatunkowo, a nawet osobniczo i stanowi pierwotne źródło informacji genetycznej.

Podwójna helisa DNA



komplementarne parowanie zasad



Kwasy rybonukleinowe – RNA

Kwasy rybonukleinowe mają znacznie mniejsze masy cząsteczkowe niż kwasy DNA. Występują zarówno w cytoplazmie, jak w jądrze komórkowym, choć większość z nich jest wytwarzana w jądrze, a geny określające ich strukturę znajdują się w jądrowym DNA. Wyjątkiem są RNA organelli komórkowych zawierających DNA (mitochondria, chloroplasty), których geny zlokalizowane są w DNA tych organelli.

Kwasy rybonukleinowe są zbudowane, podobnie jak DNA, z nukleotydów połączonych wiązaniem fosfodiestrowym. Składnikiem cukrowym w ich nukleotydach jest ryboza, a zasadami azotowymi – A, G, C i U. RNA występuje zazwyczaj w postaci pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych, wytwarzających połączenia pomiędzy komplementarnymi zasadami tej samej nici. Wytwarzają się w ten sposób regiony o strukturze heliksowej z komplementarnymi zasadami oraz pętle zbudowane z pojedynczej nici. Wyjątek stanowią dwuniciowe łańcuchy RNA występujące np. u retrowirusów.

Biosynteza RNA – transkrypcja

Biosynteza RNA w znacznej części jest związana z przepisanie m informacji zawartej w strukturze pierwszorzędowej DNA i dlatego bez względu na rodzaj frakcji nazywana jest transkrypcją. Jest więc ona ogniwo wiążącym swoistość białek z aparatem genetycznym przez przepływ informacji zwany ekspresją genów: **DNA → RNA → białka**

Transkrypcja jest procesem biosyntetycznym, wspólnym dla wszystkich komórek żywych i wykazującym istotne różnice pomiędzy organizmami pro- i eukariotycznymi, które m.in. wynikają ze struktury matrycy DNA.

RNA komórkowy dzieli się na kilka frakcji, w zależności od funkcji, różniących się m. in. masą cząsteczkową:

- 1) **RNA informacyjny (matrycowy) – mRNA** – ma masę cząsteczkową zróżnicowaną, zależnie od liczby przenoszonych informacji i występuje zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie; jego skład nukleotydowy jest dopełniający w stosunku do określonej struktury DNA, w kontakcie z którą powstaje, a więc jego funkcja polega na przenoszeniu do miejsc syntezy białka informacji zawartych w DNA. Dotyczą one kolejności dołączanych aminokwasów. mRNA występuje w komórce w ilości 2-3% całego RNA i jest na ogół krótkotrwały.

U organizmów prokariotycznych informacje w genach zapisane są w sposób ciągły, natomiast u organizmów eukariotycznych geny podzielone są intronami. U *Eucaryota* jako bezpośredni produkt transkrypcji w jądrze pojawia się pre-mRNA (łącznie z odcinkami odpowiadającymi intronom) a w wyniku procesu dojrzewania (tzw. dojrzewanie lub splicing) odcinki odpowiadające intronom są wycinane i powstaje mRNA, które (przez pory w błonie) opuszcza jądro i wędruje do rybosomów. Cząsteczka

mRNA jest odczytywana zwykle przez kilkanaście rybosomów jednocześnie, w układzie zwanym polirybosomem (polisomem).

Współzależność zapisu w kolejnych fragmentach mRNA i kolejności aminokwasów w wytwarzanym łańcuchu peptydowym jest określana jako alfabet genetyczny lub kod genetyczny. Natomiast fragment sekwencji nukleotydów na mRNA określający jeden aminokwas określany jest kodonem.

- 2) **RNA rybosomowy – rRNA** – ma największą masę cząsteczkową ($0,5-2 \cdot 10^6$ Da); występuje w rybosomach, gdzie pełni aktywne funkcje strukturalne, gdyż w połączeniu z określonymi białkami i mRNA stanowi matrycę, na której wytwarzają się łańcuchy polipeptydowe. rRNA występuje w komórce w ilości ok. 80% całego RNA.
- 3) **RNA transportujący – tRNA** – występujący z reguły w cytoplazmie podstawowej i mający masę cząsteczkową ok. 25 kDa. Jego struktura, zarówno pierwotna jak i wtórna jest dobrze poznana, a funkcja polega na wiązaniu i przenoszeniu zaktywowanych aminokwasów do miejsc biosyntezy białka, czyli rybosomów. tRNA występuje w komórce w ilości ok. 15% całego RNA.

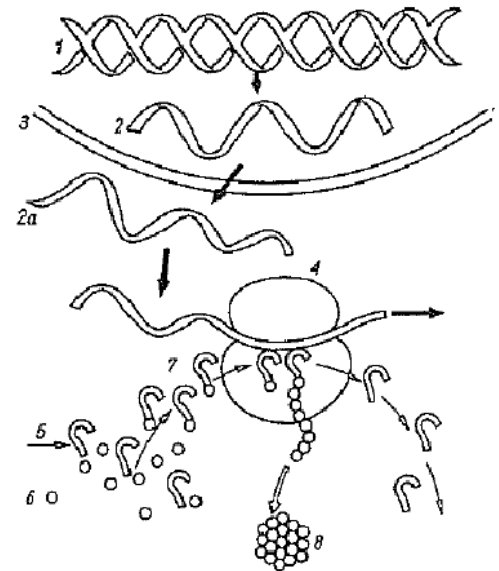
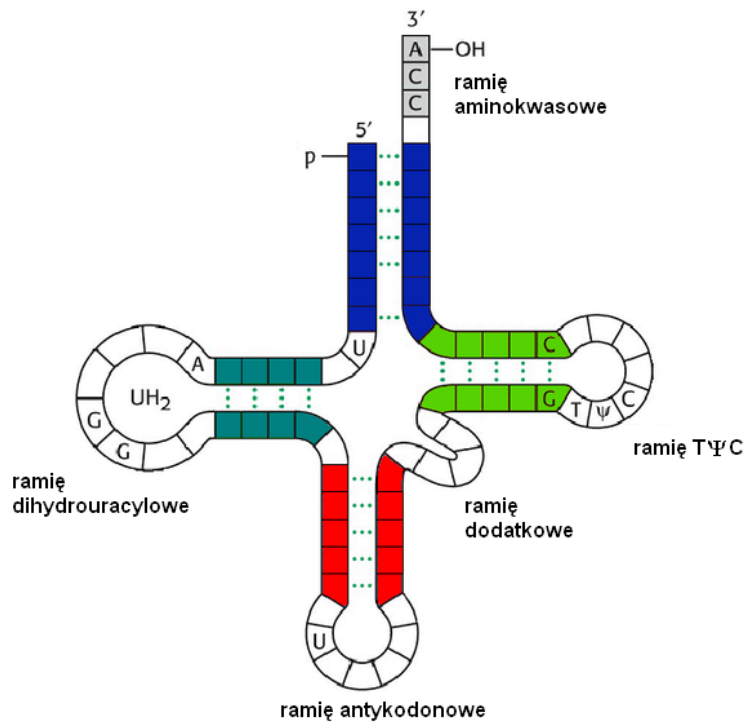
Antykodon stanowi trójkę zasad, która jest znakiem rozpoznawczym tRNA, gdyż ma wpływ na wiązanie określonego aminokwasu oraz jest specyficzny dla miejsca związania z matrycowym RNA na rybosomie. Te dwie specyficzności umożliwiają umieszczenie odpowiedniego aminokwasu we właściwym miejscu tworzącego się na rybosomie łańcucha peptydowego.

Struktura drugorzędowa tRNA przypomina liść koniczyny. Zawiera kilka regionów zbudowanych z części heliksowej oraz pętli niepołączonych wiązaniami wodorowymi. Wyróżnia się ramię aminokwasowe, dihydrouracylowe, antykodonowe, ramię dodatkowe i ramię TΨC – z charakterystyczną sekwencją zasad: tymina (T), pseudouracyl (Ψ, psi) i cytozyna (C).

Każde z wymienionych ramion pełni inną funkcję:

- ramię dihydrouracylowe zawiera informację jaki rodzaj aminokwasu może być przyłączony do danego tRNA,
- ramię aminokwasowe (akceptorowe) – zawiera sekwencję CCA, która bezpośrednio wiąże aktywowane aminokwasy za pomocą wiązania estrowego (kompleks tRNA-aminokwas nosi nazwę aminoacylo-tRNA),
- ramię dodatkowe (zmienne) – nie zawsze obecne w tRNA
- ramię TΨC (rybotymidowe, pseudourydynowe) – służy do łączenia się z rybosomem i umocowania tRNA na matrycy
- ramię antykodonowe – odpowiedzialne jest za rozpoznanie i związanie z kodonem w mRNA. Sekwencja antykodonowa rozpoznaje komplementarny tryplet nukleotydów

tworzących kodon, na cząsteczce mRNA (w taki sposób następuje odczyt informacji genetycznej).



Schemat budowy tRNA

<http://pl.wikipedia.org>

Składniki i etapy biosyntezy białka;

1 – DNA, 2- mRNA jądrowy, 2a mRNA dojrzały (po opuszczeniu jądra), 3 – błona jądrowa, rybosom, 5 – tRNA, 6 – aminokwas, 7 – aminoacylo-tRNA, 8 – wytworzone białko (Rys. Kączkowski, 2005)

- 4) **małocząsteczkowe grupy frakcji RNA**, m.in. snRNA (mały jądrowy RNA) serii U (bogaty w UMP), które jako jednostki katalityczne uczestniczą w dojrzewaniu mRNA w jądrze eukariota. Odpowiednie frakcje snoRNA, występują w jąderku i uczestniczą w modyfikacjach rRNA oraz scRNA, które występują w cytozolu.

Część doświadczalna

Ćwiczenie 10

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA)

Doświadczenie 1. Izolacja DNA z cebuli

W komórkach żywych organizmów znajduje się jądro komórkowe, a w nim kwasy nukleinowe, DNA i RNA.

Zastosowana w doświadczeniu metoda izolacji opiera się na cechach chemicznych tych związków, dlatego za jej pomocą izoluje się zarówno DNA, jak i RNA.

Kwasy nukleinowe można wyizolować dość łatwo metodą przypominającą procedury używane w laboratoriach. Oto wytłumaczenie jej etapów:

1. Rozcieranie tkanek: tkanki muszą zostać pofragmentowane na komórki, a komórki muszą popękać, żeby wydobyć z nich DNA. Intensywne oddziaływanie mechaniczne jest znakomitą metodą rozbijania tkanek na pojedyncze komórki. Jest to szczególnie ważne w przypadku komórek roślinnych, które otoczone są grubą ścianą komórkową – mechaniczne oddziaływanie narusza jej strukturę.

2. Dodatek detergentu powoduje, że rozpadają się błony komórkowe (złożone z lipidów, które mają charakter tłuszczowy), a wewnątrz komórki wydostaje się do roztworu (liza komórki).

3. Po uwolnieniu wnętrza komórek DNA narażony jest na degradację (rozkład na składniki budulcowe) i fragmentację. Niska temperatura hamuje aktywność enzymów degradujących DNA, a obecność soli powoduje wytrącanie tych białek z roztworu.

4. Na filtrze zostają wszystkie niepotrzebne elementy tkanek – duża ilość DNA znajduje się w przesączu.

5. DNA jest kwasem, którego reszty naładowane są ujemnie. Dzięki temu jony Na^+ z soli kuchennej otaczają cząsteczki DNA. Przy wysokim stężeniu soli w obecności etanolu DNA zmienia swoją przestrzenną strukturę i tworzy agregaty (duże, nieuporządkowane kompleksy) – wytrąca się. Dzięki temu jest widoczny jako długie nitki.

UWAGA – DŁUGIE NITKI TO NIE POJEDYNCZE CZĄSTECZKI DNA! SĄ ONE ZBYT MAŁE, ŻEBY JE ZOBACZYĆ BEZ BARDZO SILNEGO MIKROSKOPU!

DNA jest związkiem, w którego strukturze zapisana jest informacja genetyczna. Cząsteczki RNA służą do odczytywania tej informacji. W DNA zapisane są informacje o budowie wszystkich białek komórkowych (takie fragmenty DNA nazywa się genami). Geny to jednak jedynie niewielka część DNA (np. w komórkach ssaków stanowią tylko 3%). Reszta sekwencji służy do regulacji procesu odczytywania informacji, nadaje DNA strukturę, odpowiada za powielanie materiału genetycznego i przekazywanie go do komórek potomnych i pełni wiele innych funkcji. Kwasy nukleinowe regulują wszelkie procesy życiowe komórek, a co za tym idzie – całych tkanek i organizmów.

Materialy:

- Pół cebuli
- 10 ml płynu do naczyń (detergent)
- 4 g NaCl
- 90 ml wody
- 10 ml 96% etanolu (alkohol należy schłodzić w lodzie)
- Sączek

Przebieg doświadczenia:

1. W pierwszej zlewce przygotować **roztwór soli rozpuszczając 4g NaCl w 90 ml wody**.
2. Do drugiej zlewki nalać **10 ml detergentu**.
3. **Wlać** przygotowany w punkcie nr 1 **roztwór soli do naczynia z detergentem i delikatnie wymieszać**, tak aby się nie spenił.
4. Obrąć **cebule** i pokroić w **bardzo drobne kawałki**.
5. Włożyć pokrojone kawałki do **zlewki** i zalać roztworem **soli kuchennej z detergentem**.
6. Zlewkę zakryć folią i inkubować w temperaturze **60°C przez 15 minut**.
7. Następnie przenieść zlewkę do **naczynia z lodem na 5 minut**.
8. Przebrać mieszaninę do **moździerza i energicznie rozetrzeć**.
9. Mieszaninę należy **przefiltrować** przez sączonek korzystając z **metody próżniowej (Uwaga! Poprosić o pomoc prowadzącego)**. Uważać, aby piana z detergentu w mieszaninie nie dostała się do przesącza.
10. Do **30 ml** przesącza dodać **szczyptę NaCl** i pozostawić na **5 minut**.
11. Po upływie 5 minut bardzo ostrożnie i **powoli nalewać po ściance do zlewki zmrożony etanol**, w takiej samej objętości jak przesącz.
12. **Po chwili DNA będzie wytrącać się do warstwy alkoholowej w postaci cienkich i długich kłaczek**.

Doświadczenie 2. Reakcja Feulgena na deoksyrybozę

Zasada metody: Deoksyryboza uwolniona w kwasowym środowisku z DNA (hydroliza wiązania β -glikozydowego i uwolnienie grupy aldehydowej) daje dodatni odczyn z odczynnikami Schiffa. Reakcja Feulgena z odczynnikami Schiffa jest szeroko stosowana w metodach histochemicznych do wybiórczego wybarwienia jąder i chromosomów.

Wykonanie:

1. Przygotować dwie probówki: do pierwszej wprowadzić 1 ml wody destylowanej a w drugiej umieścić kłaczek DNA uzyskany w doświadczeniu nr 1, a następnie nalać ml wody destylowanej.
2. Do obydwu probówek dodać po 5-6 kropli 1 M roztworu HCl i probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej na okres 5 minut.
3. Po wyjęciu probówek z łaźni, ochłodzić je w strumieniu zimnej wody, a następnie umieścić w nich papierki wskaźnikowe i doprowadzić pH roztworów do 7-8 za pomocą 1 M NaOH (Uwaga! Wystarczy kilka kropli).
4. Następnie dodać po 2 ml odczynnika Schiffa do każdej z probówek. Po ok. 3 minutach w probówce zawierającej zhydrolizowane DNA następuje wybarwienie deoksyrybozy na czerwono.

Ćwiczenie 11

Kwas rybonukleinowy (RNA)

Doświadczenie 1. Izolacja kwasu rybonukleinowego z drożdży

Zasada:

Opisana poniżej metoda izolowania drożdżowego RNA polega na rozbiciu komórek, usunięciu z roztworu białek i DNA za pomocą roztworu siarczanu dodecylu sodu (SDS), a następnie wytrąceniu RNA za pomocą etanolu.

Wykonanie:

1. 25 ml 6% roztworu SDS ogrzać do wrzenia (na płytce grzejnej) w zlewce o poj. 150 ml przy stałym mieszaniu.
2. Do **wrzącego roztworu SDS dodać 10 g dokładnie rozdrobnionych drożdży** piekarskich i kontynuować ogrzewanie przez 1 minutę (na płytce grzejnej).
3. Następnie zlewkę przenieść do **wrzącej łaźni wodnej** i ogrzewać nadal, stale mieszając przez 2 minuty.
4. Zlewkę ochłodzić w łaźni lodowej do **temperatury 4°C** (chłodzenie należy przeprowadzić przy stałym mieszaniu w celu przyspieszenia procesu) i po oziębieniu wirować w przy **3000 obr./min. przez 10 minut w temp. 4°C** (program 1) – **poprosić o pomoc prowadzącego!**
5. Po zakończeniu wirowania **plyn nad osadu (supernatant)** zebrać do cylindra miarowego i zmierzyć jego objętość. **Uwaga! Osad uzyskany po pierwszym wirowaniu nie będzie już używany w dalszej części doświadczenia!**
6. W drugim cylindrze miarowym odmierzyć **oziębiony w lodzie alkohol etylowy** → **jego objętość powinna być 2x większa niż objętość supernatantu z punktu nr 5.**
7. Odmierzony alkohol wlać do **zlewki**, a następnie **do tej samej zlewki** przelać supernatant i zlewkę wraz z zawartością umieścić w łaźni lodowej na **5 minut.**
8. Po upływie 5 minut odwirować (w warunkach opisanych powyżej, program 1) **osad wytrąconego RNA.**
9. **Uzyskany osad** zawiesić w **7 ml wody destylowanej** i użyć do wykonania kolejnych doświadczeń.

Doświadczenie 2. Kwasowa hydroliza RNA i wykrywanie obecności zasad purynowych

a) hydroliza RNA

Zasada:

Kwasy nukleinowe ogrzewane z kwasami mineralnymi ulegają stopniowej hydrolizie do nukleotydów, nukleozydów i wolnych zasad z jednoczesnym uwolnieniem pentoz i kwasu fosforowego. W celu rozłożenia RNA stosuje się ogrzewanie w roztworach 1 M kwasu solnego lub 10% kwasu siarkowego w temperaturze 100°C.

Wykonanie: W probówce umieścić 1 ml zawiesiny RNA uzyskanej w poprzednim ćwiczeniu. Do probówki dodać 1 ml 1 M kwasu solnego i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut.

b) wykrywanie zasad azotowych w hydrolizacie RNA

Zasada:

Zasady azotowe reagują z jonami Ag^+ lub Cu^+ , tworząc nierozpuszczalne sole kompleksowe.

Wykonanie: Do probówki wprowadzić hydrolizat RNA otrzymane w **zad. 2a**. Do hydrolizatu dodać 2,5% roztworu amoniaku do uzyskania słabo zasadowego odczynu (kontrolować papierkiem wskaźnikowym). Następnie roztwór przesączyć przez sączek. Do klarownego przesączu dodać ok. 0,5 ml 5% roztworu AgNO_3 . Wytrąca się osad soli srebrnych puryn nierozpuszczalnych w amoniaku.

Doświadczenie 3. Rozpuszczalność kwasów nukleinowych

Wykonanie: Do 1 ml roztworu RNA (wyzolowanego w **zad. 1**) dodać kroplami 0,1 M roztwór HCl. Wytrąca się osad kwasu nukleinowego. Następnie do tej samej probówki dodać kroplami 0,1 M roztwór NaOH – osad ulega ponownemu rozpuszczeniu.

Wyjaśnienie: Kwasy nukleinowe, z racji wielkości cząstek, tworzą w roztworach wodnych układy koloidowe, a dzięki dużej zawartości reszt kwasu fosforowego mają odczyn kwasowy. Dlatego też rozpuszczają się dobrze w środowisku zasadowym, trudniej w H_2O i rozcieńczonych roztworach CH_3COOH . Silne obniżenie pH roztworu lub dodanie czynników odwadniających doprowadza do odwracalnego wytrącania kwasów nukleinowych.

Doświadczenie 4. Tworzenie kompleksów z barwnikami

Wykonanie: Do 1 ml roztworu RNA (wyzolowanego w **zad. 1**) dodać 0,1 M roztwór CH_3COOH aż do wystąpienia lekkiego zmętnienia. Następnie wprowadzić 2-3 krople 0,1% roztworu błękitu metylenowego i intensywnie wytrząsać. Wytrąca się niebieski osad.

Wyjaśnienie: W kwasowym środowisku RNA i DNA wiążą zasadowe barwniki. Tę właściwość wykorzystuje się w badaniach komórek i tkanek metodami histochemicznymi. Najpopularniejszą metodą pozostaje wybarwienie jąder komórkowych zasadową hematoksyliną. Oddziaływanie różnych barwników znalazło zastosowanie w technice prążkowego barwienia chromosomów metafazowych (ostatnio też prometafazowych i parofazowych). Takie barwienie umożliwia wykrycie 400-1250 prążków, ułożonych poprzecznie w stosunku do długiej osi chromatyd i różniących się szerokością oraz intensywnością wybarwienia. Wzór prążkowy powstaje w wyniku kondensacji kwasów nukleinowych pod wpływem określonych barwników. Na zjawisko to istotny wpływ mają także różne białka, swoiście współtworzące wyższego rzędu struktury włókien nukleoproteidowych. Ciemne prążki są widoczne po wybarwieniu odczynnikiem Giemzy (prążki G) lub fluorescencyjnym barwnikiem kwinakryną (quinacrine, prążki Q). Odpowiadają one regionom nici nukleoproteidowej o dużej zawartości par zasad A-T, regionom jednocześnie późno replikującym i charakteryzującym się małą zawartością genów aktywnych transkrypcyjnie. Prążki jasne wykazują przeciwstawne właściwości replikacyjno-transkrypcyjne, a nadto skład białek w tych obszarach jest zdecydowanie inny niż w prążkach ciemnych. Wzory prążkowe pozwalają identyfikować chromosomy, umożliwiają wykrywanie i lokalizację określonych genów lub odcinków znacznikowych w strukturze chromosomów, a także w precyzyjny sposób ujawniają ich zmiany translokacyjne i aberracyjne.

Literatura:

1. Biochemia, Autor: Jeremy Berg, Lubert Stryer, John L. Tymoczko, PWN Warszawa 2005
2. Biochemia, Autor: Lubert Stryer, PWN Warszawa 1999
3. Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa pod red. L. Kłyszajko-Stefanowicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
4. Praktikum z biochemii. Praca zbiorowa pod red. A. Dubina i B. Turyny. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.
5. Podstawy biochemii. Kączkowski J. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2005.
6. www.wikipedia.org