

Laboratorium z biochemii

DLA STUDENTÓW BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA

Praca zbiorowa pod redakcją *Antoniego Polanowskiego*
Poprawki do wydania III wprowadzone pod redakcją
Justyny Ciuraszkiewicz i Elżbiety Gocek

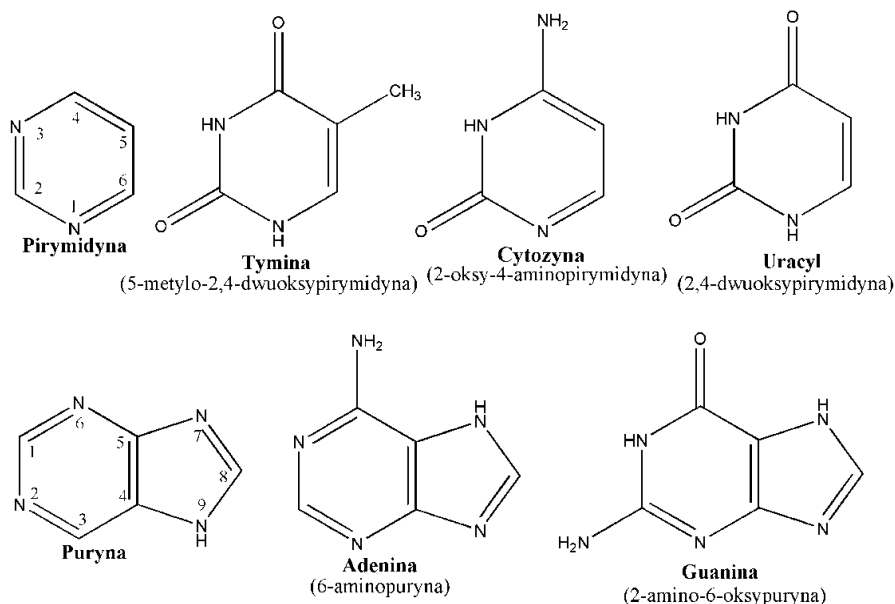
6. KWASY NUKLEINOWE

Autorzy: Ryszard Rzepecki, Janina Wiśniowska (ed. Elżbieta Gocek)

6.1	Budowa kwasów nukleinowych	2
6.1.1	Kwasowa hydroliza RNA	6
6.1.2	Wykrywanie kwasu fosforowego w hydrolizacie RNA	6
6.1.3	Wykrywanie puryn poprzez reakcję z amoniakalnym roztworem azotanu srebra	7
6.1.4	Wykrywanie puryn poprzez reakcję z siarczanem (VI) miedzi (II)	7
6.1.5	Oznaczanie RNA metodą orcynową	7
6.1.6	Oznaczanie DNA metodą z difenylaminą (DFA)	8
6.2	Widmo absorpcyjne kwasów nukleinowych oraz efekt hiperchromowy	8
6.2.1	Wyznaczanie widma absorpcyjnego kwasów nukleinowych	9
6.2.2	Oznaczanie efektu hiperchromowego	9
6.2.3	Oznaczanie ilościowe kwasów nukleinowych metodą spektrofotometryczną	9
6.3	Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych	9
6.3.1	Rozdział elektroforetyczny DNA oraz produktów jego enzymatycznej degradacji w 0,8% agarozie	10
6.3.2	Enzymatyczna degradacja kwasów nukleinowych	12
6.3.3	Degradacja wysokocząsteczkowego DNA różnymi ilościami DNAzy	13
6.3.4	Analiza trawienia DNA plazmidowego enzymem restrykcyjnym <i>Eco RI</i>	14
6.4	Izolacja DNA z komórek bakteryjnych	14
6.4.1	Otrzymywanie DNA chromosomowego z <i>E. coli</i>	14
6.4.2	Izolacja DNA plazmidowego	15
6.5	Preparacja RNA z drożdży	16

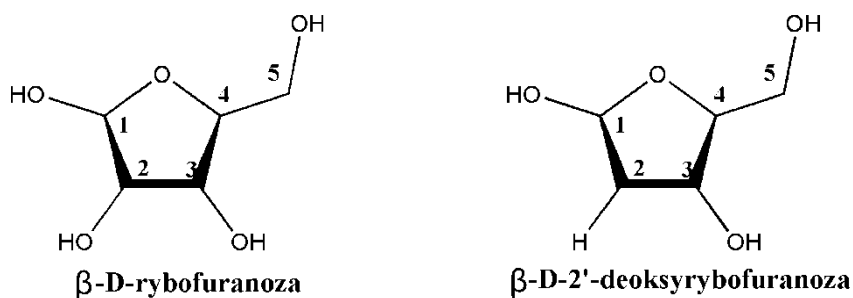
6.1. BUDOWA KWASÓW NUKLEINOWYCH

Kwasy nukleinowe są uniwersalnym materiałem genetycznym wszystkich organizmów. Ze względu na budowę chemiczną komponentów kwasy nukleinowe możemy podzielić na kwasy deoksyrybonukleinowe (DNA) oraz kwasy rybonukleinowe (RNA). Kwasy nukleinowe zbudowane są z trzech rodzajów składników: zasad azotowych, cukrów – pentoz oraz kwasu ortofosforowego.



Rys. 6.1 Podstawowe zasady azotowe występujące w kwasach nukleinowych

Zasady azotowe występujące w kwasach nukleinowych to pochodne pirymidyny i puryny. W skład kwasów nukleinowych wchodzi przeważnie tylko cztery zasady azotowe – dwie puryny: adenina (6-aminopuryna) i guanina (2-amino-6-oksypuryna) oraz dwie pirymidyny: cytozyna (2-oksyo-4-aminopirymidyna) i tymina (5-metylo-2,4-dioksypirymidyna) (Rys. 6.1). Taki skład zasad azotowych jest charakterystyczny dla DNA. W przypadku RNA zamiast tyminy występuje uracyl (2,4-dioksypirymidyna). W przypadku niektórych rodzajów RNA (np. tRNA) mamy do czynienia z występowaniem tzw. zmodyfikowanych zasad azotowych takich jak rybotymina, dihydrouacyl, pseudouracyl, tiouracyl, 3'- i 5'-metylocytozyna, inozyna, izopentenyloadenina, 7-metyloguanina itd. DNA różni się od RNA obecnością 2'-deoksyrybozy (β -D-2'-deoksyrybofuranozy) jako cukru (Rys. 6.2). W RNA występuje ryboza (β -D-rybofuranaza). Zasady azotowe połączone są z pentozami poprzez pierwszy atom węgla furanozy. Takie połączenie zasady azotowej z pentozą nosi nazwę nukleozydu. W związku z tym nukleozydy występujące w DNA to: adenozyzna, guanozyzna, tymidyna oraz cytydyna. Nukleozydy występujące w RNA to: adenozyzna, guanozyzna, cytydyna oraz urydyna. Z chemicznego punktu widzenia nukleozydy pirymidynowe są 1- β -D-rybofuranazydami lub 1- β -D-2'-deoksyfuranazydami. Nukleozydy purynowe są to albo 9- β -D-rybofuranazydy lub 9- β -D-2'-deoksyrybofuranazydy.

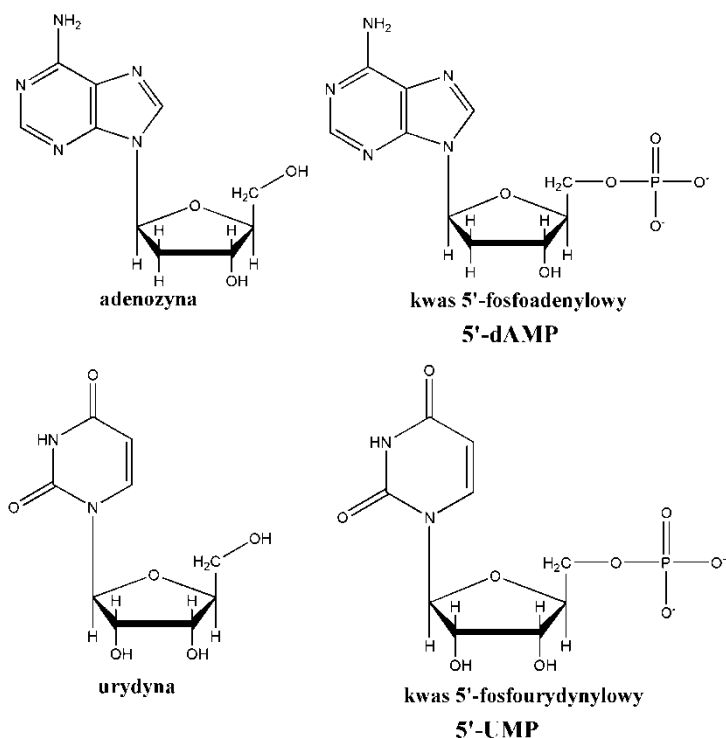


Rys. 6.2 Pentozy obecne w kwasach nukleinowych

Estry kwasu ortofosforowego oraz nukleozydów nazywane są nukleotydami (Rys. 6.3). Estryfikacji mogą ulegać grupy hydroksylowe w pierścieniu cukrowym położone przy atomach węgla: trzecim (3') lub/i piątym (5'). Kwasy nukleinowe tworzą struktury wysokopolimeryzowane, w których nukleozydy połączone są ze sobą wiązaniami fosfodiesterowymi – jedna reszta kwasu ortofosforowego tworzy wiązanie estrowe z węglem 3' oraz 5' (Rys. 6.4).

Nazwy nukleotydów zwykle piszemy skrótowo w postaci trójliterowej. Skrót określa zarówno rodzaj zasady azotowej (A, G, T, C, U), typ pentozy wchodzącej w skład nukleotydu (np. dATP = trifosforan deoksyadenozyny; ATP = trifosforan adenozy; UTP = trifosforan urydyny, dTTP = trifosforan deoksytymidyny; dCTP = trifosforan deoksycytozyny) oraz stopień ufosforylowania danego nukleotydu (np. AMP, ADP lub ATP).

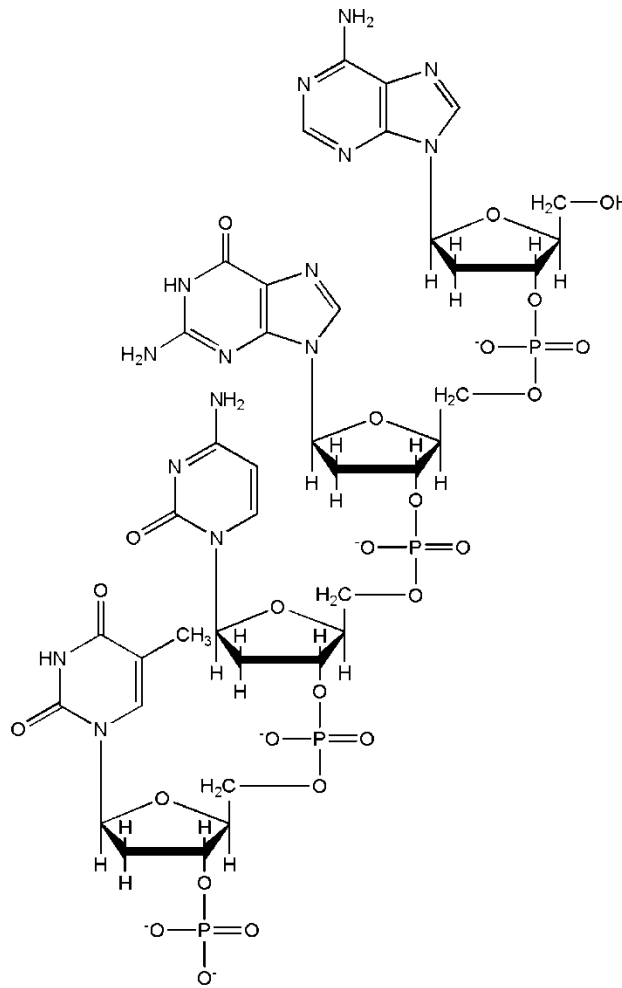
DNA jest makrocząsteczką zbudowaną z dwóch komplementarnych nici połączonych wiązaniami wodorowymi pomiędzy zasadami azotowymi. Podstawową jednostką budującą DNA są nukleotydy (zasada azotowa połączona wiązaniem N-glikozydowym z deoksyrybozą zestryfikowaną resztą kwasu fosforowego). Nukleotydy łączą się między sobą tworząc łańcuch DNA poprzez reszty kwasu fosforowego pomiędzy węglami C₅ i C₃ cukru. W nici DNA wyróżniamy 3'-koniec – koniec, na którym deoksyryboza ma wolną grupę OH przy węglu C₃ oraz 5'-koniec – koniec, na którym deoksyryboza ma wolną resztę kwasu fosforowego, estryfikującą grupę OH przy węglu C₅. Ułożenie komplementarnych nici jest w DNA antyrównoległe – tzn. 3'-koniec jednej nici jest parowany przez 5'-koniec drugiej nici i na odwrót. Kolejność zasad azotowych od 5'-końca do 3'-końca stanowi tzw. strukturę pierwszorzędową DNA i determinuje kod genetyczny jaki niesie dana nić kwasu nukleinowego. Komplementacja obu nici DNA polega na tym, że adenina tworzy zawsze parę z tyminą – A=T, połączoną dwoma wiązaniami wodorowymi, a cytozyna tworzy zawsze parę z guaniną – C≡G, połączoną trzema wiązaniami wodorowymi (Rys. 6.5). Stosunek ilości par A=T do ilości par G≡C jest stały i charakterystyczny dla danego gatunku.



Rys. 6.3 Struktura nukleozydu i nukleotydu dla adeniny i uracylu

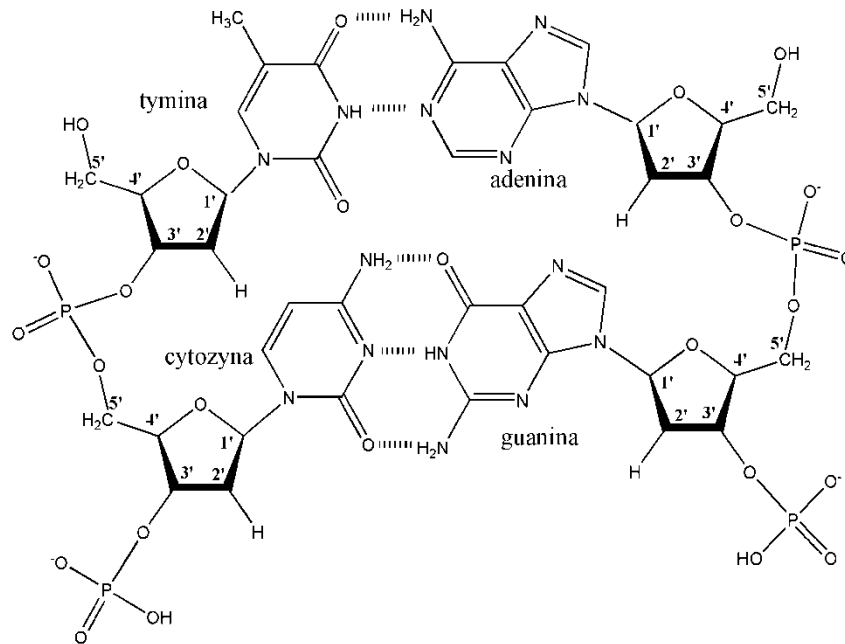
Najczęściej występującą formą natywną dwuniciowego DNA jest forma o strukturze drugorzędowej typu podwójnej, prawoskrętnej helisy, której skok linii śrubowej wynosi 3,4 nm co stanowi 10 par zasad. Grubość helisy wynosi ok. 1,1 nm, a odległość pomiędzy sąsiadującymi parami zasad wynosi 0,33 nm. Obserwując helisę z boku widzimy, że tworzy ona dwa rowki – tzw. bruzdę dużą i bruzdę małą. Budowa dwuniciowej cząsteczki DNA oraz zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia struktur dwuniciowych przez parowanie zasad obszarów o homologicznej sekwencji determinuje sposób syntezy kwasów nukleinowych. Synteza kwasu

nukleinowego w organizmach żywych jest wynikiem jego polimeryzacji (polimeryzacja DNA lub RNA) z monomerów (trifosforanów nukleotydów) z wykorzystaniem jako matrycy istniejącej nici kwasu. Procesy te są katalizowane przez specyficzne enzymy – wielopodjednostkowe białka o nazwie polimerazy. Polimerazy DNA zależne od DNA syntetyzują nić DNA korzystając z matrycy w postaci DNA. Polimerazy RNA zależne od DNA syntetyzują nić RNA korzystając z matrycy w postaci DNA. Stosunkowo niedawno poznano nową klasę - polimerazy DNA zależne od RNA (tzw. odwrotne transkryptazy), które katalizują syntezę nici DNA korzystając z matrycy w postaci RNA. W organizmach występują zatem trzy sposoby namnażania kwasów nukleinowych mianowicie, polimeryzacja DNA na matrycy DNA zwana replikacją, polimeryzacja RNA na matrycy DNA zwana transkrypcją oraz polimeryzacja DNA na matrycy RNA zwana odwrotną transkrypcją.

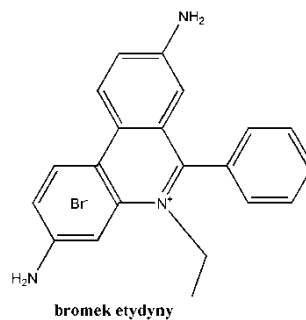


Rys. 6.4 Schemat budowy fragmentu jednej nici DNA złożonej z czterech nukleotydów o sekwencji: 5'-AGCT-3'
 Uwzględniając obecność reszt kwasu ortofosforowego zapis sekwencji wyglądałby następująco: 5'OH-ApGpCpT-3'p.

Kwasy nukleinowe oraz ich monomery (nukleotydy, nukleozydy oraz zasady azotowe) absorbują promieniowanie ultrafioletowe (nadfioletowe). Wynika to z obecności pierścieni heterocyklicznych w zasadach azotowych. Jest to podstawą spektrofotometrycznych metod wykrywania i ilościowego oznaczania kwasów nukleinowych. Denaturacja termiczna dwuniciowego DNA (zerwanie wiązań wodorowych pomiędzy zasadami komplementarnymi) powoduje tzw. **efekt hiperchromowy**. Jest to podwyższenie absorbancji roztworu kwasu nukleinowego po przyjęciu struktury jednoniciowej i nieuporządkowanej. Przy spektrofotometrycznym oznaczaniu DNA przyjmuje się, że absorbancja promieniowania ultrafioletowego o długości fali $\lambda = 260 \text{ nm}$ dla roztworu wodnego dwuniciowego DNA o stężeniu $50 \mu\text{g/ml}$ (przy długości drogi optycznej (l) równej 1 cm) wynosi $1,0$. Dla jednoniciowego DNA oraz RNA absorbancja równa $1,0$ oznacza, że roztwór powinien mieć stężenie $40 \mu\text{g/ml}$. Do detekcji i wizualizacji (barwienia) kwasów nukleinowych stosuje się różne metody. Klasyczną metodą wykorzystywaną do detekcji kwasów nukleinowych po rozdiale elektroforetycznym w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym jest barwienie przy pomocy bromku etydyny (Rys. 6.6).



Rys. 6.5 Schemat tworzenia struktury dwuniciowego DNA poprzez tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami azotowymi z dwóch nici



Rys. 6.6 Schemat struktury bromku etydyny

Bromek etydyny ma zdolność fluorescencji, czyli po wzbudzeniu światłem ultrafioletowym emituje światło czerwono-pomarańczowe. Ponieważ bromek etydyny wiąże się specyficznie do kwasów nukleinowych możemy je wykryć poprzez obserwację/fotografię emitowanego promieniowania.

W komórce eukariotycznej DNA występuje w jądrze komórkowym w formie chromosomów. Wielkość genomu kręgowców wynosi ok. 4×10^8 par zasad. U roślin waha się w przedziale od ok. 1×10^7 do ok. 10^{11} par zasad, a u owadów wynosi ok. $1,6 \times 10^8$. W chromosomach DNA występuje w formie helisy silnie skręconej i nawiniętej na białka o charakterze zasadowym – histony. Budują one podstawowe podjednostki chromatyny i chromosomów – tzw. nukleosomy, które odpowiednio skręcone i upakowane dają nam tzw. włókno chromatynowe o średnicy ok. 30 nm. Włókno chromatynowe tworzy szereg pętli poprzez zakotwiczenie włókna chromatynowego do struktury szkieletowej chromatyny. Fizyczna wielkość DNA w tak utworzonych pętlach waha się w przedziale od ok. 40 kpz do 300 kpz. Chromatyna jądra interfazowego występuje zwykle w takiej postaci. W trakcie przygotowania komórki do podziału (mitozy, mejozy) chromatyna ulega kondensacji w struktury chromosomów mitotycznych. Maksimum kondensacji przypada na metafazę. Chromosomy metafazowe są najbardziej skondensowaną (upakowaną) formą chromatyny. Stopień upakowania sięga ok. 10 000 razy. Każdy chromosom zawiera silnie upakowaną jedną dwuniciową cząsteczkę DNA. Gdyby cząsteczki DNA występujące w chromosomach jednej komórki człowieka skleić ze sobą w jedną nić DNA i rozwinąć ją do formy dwuniciowej α -helisy (spirali) to taka cząsteczka miałaby ok. 1,8 metra długości.

DNA chromosomowy komórek eukariotycznych zawiera informację o budowie i funkcjonowaniu komórek oraz całego organizmu. Informacja ta występuje w formie genów oraz „instrukcji” (informacji) jak ich używać. Kod genetyczny jest trójkowy – trzy zasady azotowe w nici DNA w kolejności od 5'-końca do 3'-końca kodują jeden aminokwas w łańcuchu peptydowym lub stanowią sygnał „STOP translacja”. U eukariontów geny mają budowę nieciągłą. W ich obrębie występują tzw. egzony czyli obszary kodujące sekwencję białek i introny – obszary

niekodujące o bliżej niepoznanej funkcji, przedzielające egzony. Białka nie zawierają aminokwasów odpowiadających sekwencji intronów, gdyż regiony te po przepisaniu na mRNA są usuwane w jądrze przed procesem syntezy białek. W DNA chromosomowym poza genami kodującymi sekwencję aminokwasów w białkach występują geny kodujące wszystkie rodzaje RNA (poza mRNA). Tak więc w genomach organizmów mamy geny dla białek, całej grupy rRNA, wszystkich tRNA oraz coraz bardziej licznej grupy różnych RNA określanych mianem snRNA (ang. *small nuclear* – małe jądrowe RNA). Znaczna część snRNA występuje w jąderkach tworząc osobną pulę tzw. snoRNA (ang. *small nucleolar* – małe jąderkowe RNA) biorącą udział w dojrzewaniu i obróbce (ang. *splicing*) rRNA. Duża część spośród puli snRNA bierze udział w dojrzewaniu i obróbce tzw. pierwotnych transkryptów mRNA.

Znaczna część DNA w genomie eukariontów nie jest składnikiem genów (nie koduje bezpośrednio informacji o sekwencji aminokwasowej białek czy sekwencji zasad RNA). Część z tego DNA stanowią obszary kontrolujące lub regulujące poziom ekspresji genów. Są to tzw. obszary regulatorowe: promotory genów i obszary wzmacniające. Obszar promotora danego genu stanowi odcinek DNA leżący bezpośrednio przed (od końca 5') genem i zawierający się w przedziale od miejsca startu transkrypcji do ok. -3 do -5kbp (u eukariontów). W obszarze promotora możemy wydzielić region promotora podstawowego (od -200pz do ok. +3-5pz), który jest wiązany przez tzw. podstawowe czynniki transkrypcyjne. Wyjątkową budowę i lokalizację promotora mają geny dla tRNA oraz 5S snRNA – obszary promotorowe tych genów leżą w obszarze poniżej punktu startu transkrypcji (są obecne w tzw. pierwotnym transkrypcie RNA tych genów).

Część z DNA, która nie jest odpowiedzialna za kodowanie genów i regulację ich transkrypcji jest odpowiedzialna za wiele niezbędnych dla organizmów cech, takich jak zdolność do prawidłowej replikacji (miejsca startu replikacji, sekwencje telomerowe), tworzenia prawidłowej struktury przestrzennej czy zdolność do segregacji do komórek potomnych (np. sekwencje centromerowe).

W komórkach eukariotycznych DNA występuje także poza jądrem komórkowym – w mitochondriach, w postaci kolistych cząsteczek, w licznych kopiach o wielkości ok. 15 tysięcy zasad (kb), kodujący część białek mitochondrialnych, niewystarczający jednak do ich funkcjonowania, a u roślin również w chloroplastach, także w postaci licznych kopii kolistych cząsteczek wielkości 120 kb, również kodujący część białek chloroplastów.

6.1.1. Kwasowa hydroliza RNA

Zasada metody

Stężone kwasy: mrówkowy czy chlorowy (VII) (nadchlorowy) hydrolizują DNA i RNA do zasad azotowych. Część z zasad azotowych ulega jednak w takich warunkach destrukcji. Inkubacja RNA przez 1 godzinę w 100°C w roztworze 1 M HCl lub H₂SO₄ powoduje jego hydrolizę do zasad purynowych i nukleozydów pirymidynowych.

Postępowanie

1. Do probówki odmierzyć 5 ml roztworu RNA.
2. Dodać 5 ml 2 M H₂SO₄. Zamknąć probówkę korkiem z rurką i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 60 min.
3. Po oziębieniu hydrolizat zachować do dalszych oznaczeń.

Materiały i odczynniki

- roztwór RNA o stężeniu 100 µg/ml
- 2 M H₂SO₄
- probówki z korkiem z chłodniczką (rurką szklaną)

6.1.2. Wykrywanie kwasu fosforowego w hydrolizacie RNA

Postępowanie

1. 0,5 ml hydrolizatu RNA zobojętnić roztworem amoniaku.
2. Dodać 0,5 ml stężonego HNO₃ i 2 ml molibdenianu amonowego.
3. Zawartość probówki ogrzać do wrzenia. Próba zabarwia się na żółto.
4. Po ostygnięciu może powstać żółty osad fosforomolibdenianu amonowego.
5. Próbę powtórzyć stosując wyjściowy roztwór RNA (przed hydrolizą).

Materiały i odczynniki

- hydrolizat RNA
- stężony HNO₃
- roztwór 2,5% molibdenianu amonowego

6.1.3. Wykrywanie puryn poprzez reakcję z amoniakalnym roztworem azotanu srebra

Postępowanie

1. Do 1 ml hydrolizatu RNA dodać rozcieńczony roztwór wodorotlenku amonu do uzyskania słabo alkalicznego odczynu. Jeśli roztwór nie jest klarowny należy go przesączyć.
2. Wprowadzać kroplami amoniakalny roztwór azotanu srebra. Powstaje osad nierozpuszczalnych w amoniaku soli srebrowych puryn.

Materiały i odczynniki

- hydrolizat RNA
- rozcieńczony wodorotlenek amonu
- 2 M amoniak
- amoniakalny roztwór azotanu srebra (do 100 ml 0,1 M AgNO_3 dodać 5 ml 2 M NaOH i 20 ml 2 M amoniaku)

6.1.4. Wykrywanie puryn poprzez reakcję z siarczanem (VI) miedzi (II)

Postępowanie

1. Do 1 ml hydrolizatu RNA dodawać 1 M NaOH do uzyskania słabo kwaśnego odczynu.
2. Roztwór ogrzać do wrzenia.
3. Dodać kilka kropli 1% CuSO_4 , a następnie dodawać kroplami nasycony roztwór NaHSO_3 . Strąca się żółto-biały osad soli miedzi (I) puryn. Kwaśny siarczan (IV) sodu redukuje jony Cu^{2+} do Cu^{1+} .

Materiały i odczynniki

- hydrolizat RNA
- 1 M NaOH
- 1% CuSO_4
- nasycony roztwór NaHSO_3

6.1.5. Oznaczanie RNA metodą orcynową

Zasada metody

Ryboza pod wpływem stężonego kwasu solnego odwadnia się do furfuralu, który w obecności Fe^{3+} daje z orcyną kompleks o barwie zielonej. Reakcję tę daje wolna ryboza, jej estry fosforanowe oraz ryboza nukleotydów i nukleozydów purynowych. Ryboza związana z pirymidynami nie tworzy tego kompleksu. Dlatego więc podczas ilościowego oznaczania RNA nie stosuje się jako wzorca wolnej rybozy, lecz standardowy roztwór RNA.

Z orcyną, oprócz rybozy, reaguje także deoksyryboza, dając jednak ok. 10-krotnie słabsze zabarwienie niż ryboza.

Postępowanie

1. 1 ml roztworu zawierającego 10–100 μg RNA i 1 ml odczynnika orcynowego (świeżo sporządzonego) zmieszać, wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 20 minut, po oziębieniu uzupełnić wodą do 4 ml. Jeżeli do oznaczenia pobiera się objętość mniejszą niż 1 ml próby badanej (ma to miejsce gdy badany roztwór zawiera więcej niż 100 μg RNA) należy uzupełnić próbę wodą tak, aby końcowa objętość testu była zawsze równa 4 ml.
2. Odczytać absorbancję dla 670 nm wobec ślepej próby odczynnikowej.
3. Wykonać pomiar absorpcji dla 100 μg RNA standardowego oraz dla próby badanej. Obliczyć stężenie RNA w 1 ml badanego roztworu, stosując przeliczenie:

$$C_b = \frac{C_{st} \times A_b}{A_{st}},$$

gdzie: C_b – stężenie próby badanej, A_b – absorbancja próby badanej, C_{st} – stężenie standardu, A_{st} – absorbancja standardu.

Materiały i odczynniki

- standardowy roztwór RNA o stężeniu 100 µg/ml
- odczynnik orcynowy: w 100 ml stężonego kwasu solnego rozpuścić 100 mg $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; bezpośrednio przed użyciem dodać orcyny w ilości 10 mg/1ml kwasu

6.1.6. Oznaczanie DNA metodą z difenylloaminą (DFA)

Zasada metody

Deoksyryboza pod wpływem stężonego kwasu siarkowego (VI) i octowego odwadnia się do furfuralu, który daje z difenylloaminą kompleks o barwie niebieskiej.

Postępowanie

1. 1 ml roztworu zawierającego 10–150 µg DNA (jeżeli objętość próby badanej jest mniejsza niż 1ml, należy ją uzupełnić wodą do tej objętości) i 2 ml odczynnika difenylloaminowego (odczynnik Dischego) zmieszać, wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 min.
2. Po oziębieniu odczytać absorbancję przy 600 nm wobec próby ślepej dla próby standardowej (75 µg DNA) oraz próby indywidualnej.
3. Obliczyć stężenie DNA w 1 ml indywidualnej próby, korzystając ze wzoru podanego w rozdziale 6.1.5.

Materiały i odczynniki

- standard DNA o stężeniu 75 µg/ml
- odczynnik difenylloaminowy (Dischego): 1 g oczyszczonej difenylloaminy (w celu oczyszczenia difenylloaminy należy handlowy preparat przekształcić z gorącego heksanu) rozpuścić w 100 ml kwasu octowego lodowatego z dodatkiem 2,75 ml stężonego kwasu siarkowego (VI)

6.2. WIDMO ABSORPCYJNE KWASÓW NUKLEINOWYCH ORAZ EFEKT HIPERCHROMOWY

Kwasy nukleinowe, nukleotydy, nukleozydy i wolne zasady azotowe pochłaniają światło ultrafioletowe w zakresie długości fal od 249 nm do 276 nm. Odpowiedzialne za to są wiązania podwójne w pozycji sprzężonej oraz heteroatomy w pierścieniach zasad purynowych i pirymidynowych. Pozostałe elementy struktury kwasów nukleinowych – grupa fosforanowa, cukier ryboza lub deoksyryboza nie wpływają na zakres pochłaniania światła ani na jego intensywność. Poszczególne zasady azotowe mają różniące się nieznacznie maksima absorbancji światła i tak: guanina posiada maksimum absorbancji przy 249 nm; adenina przy 265,5 nm; uracyl przy 260 nm; cytozyna przy 276 nm; tymina 265 nm. Różnią się one także wyraźnie intensywnością pochłaniania światła w swoich maksimach, co uwidacznia się w molowych współczynnikach absorbancji ϵ poszczególnych zasad. Wygląd krzywych widma absorbancji poszczególnych zasad purynowych i pirymidynowych zależy od pH środowiska, w którym aktualnie dokonujemy wyznaczania widma absorbancji. Kwasy nukleinowe posiadają kombinację wszystkich zasad azotowych, dlatego też mają maksimum przy średniej długości fali dla poszczególnych zasad azotowych – przy 260 nm.

Efekt hiperchromowy jest to zwiększenie absorbancji ΔA w czasie denaturacji DNA. Mierząc absorbancję DNA natywnego, a następnie jego absorbancję po denaturacji termicznej, obserwujemy zwiększenie absorbancji DNA zdenaturowanego w stosunku do DNA w formie natywnej:

$$A_{\text{DNA nat.}} < A_{\text{DNA den.}}$$

Efekt ten związany jest ze zmianą gęstości optycznej DNA w trakcie denaturacji (zmienia się także skręcalność optyczna, lepkość i współczynnik sedymentacji DNA).

Wartość charakterystyczna dla procesu denaturacji termicznej DNA to **temperatura topnienia DNA**, czyli temperatura, w której połowa DNA pozostaje jeszcze w formie natywnej, a połowa jest już w formie zdenaturowanej. Im więcej par $\text{G}\equiv\text{C}$ o potrójnym wiązaniu wodorowym w dwuniciowym DNA, tym temperatura topnienia jest wyższa, ponieważ trzeba dostarczyć więcej energii na ich zerwanie niż podwójnych $\text{A}=\text{T}$.

6.2.1. Wyznaczanie widma absorpcyjnego kwasów nukleinowych

Postępowanie

1. Zmierzyć absorbancję próbki DNA wobec wody w zakresie długości fal: od 220 nm do 300 nm (co 10 nm).
2. Wykreślić na papierze milimetrowym zależność wartości absorbancji od długości fali.

Materiały i odczynniki

- roztwór 15 μg DNA w 1ml 0,9% NaCl
- kuwety kwarcowe

6.2.2. Oznaczanie efektu hiperchromowego

Zasada metody

Podgrzewając roztwory DNA we wrzącej łaźni wodnej dokonujemy jego denaturacji termicznej. Stopniowe ochłodzenie zdenaturowanego DNA do temperatury pokojowej powoduje jego renaturację. Gwałtowne ochłodzenie DNA w łaźni lodowej utrwała formę zdenaturowaną.

Postępowanie

1. Roztwór DNA dzielimy na dwie części i umieszczamy w dwóch probówkach zamkniętych korkami z chłodniczkami.
2. Probówki umieszczamy na 10 minut we wrzącej łaźni wodnej.
3. Jedną z probówek pozostawiamy do powolnego ochłodzenia roztworu DNA w temp. pokojowej.
4. Drugą probówkę gwałtownie chłodzimy umieszczając ją w łaźni lodowej.
5. Czytamy absorpcję obu prób w zakresie długości fali od 220 do 300 nm wobec wody co 10 nm i rysujemy wykres obu widm absorbancji. Wyliczamy wartość efektu hiperchromowego występującego przy długości fali 260 nm.

Materiały i odczynniki

- roztwór 15 μg DNA w 1ml wody
- łaźnia wodna ustawiona na temperaturę 100°C
- łaźnia lodowa
- kuwety kwarcowe

6.2.3. Oznaczanie ilościowe kwasów nukleinowych metodą spektrofotometryczną

Zasada metody

Pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali świetlnej 260 nm używa się m.in. do określenia stężenia kwasu nukleinowego w próbce wiedząc, że natywny DNA (podwójna spirala) o stężeniu 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, RNA oraz zdenaturowany DNA (pojedynczy łańcuch) o stężeniu 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ odczytywane w warstwie 1 cm dla 260 nm, wykazują absorbancję 1,0.

Obliczenia można dokonać wykorzystując wzór podany w rozdziale 6.1.5.

Postępowanie

1. Oznaczyć absorbancję próbki w kuwecie o długości drogi optycznej równej 1 cm.
2. Obliczyć stężenie kwasu nukleinowego korzystając z podanego wzoru.

Materiały i odczynniki

- roztwór DNA lub RNA o nieznanym stężeniu (w przedziale od 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- kuwety kwarcowe ($l = 1\text{cm}$)

6.3. ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY KWASÓW NUKLEINOWYCH

Kwasy nukleinowe możemy rozdzielać różnymi metodami w zależności od ich rodzaju oraz potrzeb. Do rozdzielania kwasów nukleinowych pod względem ich wielkości (długości) oraz kształtu (w mniejszym stopniu) stosuje się metody chromatograficzne, elektroforetyczne oraz sedymentacyjne. Te ostatnie zwykle polegają na sedymentacji kwasów nukleinowych podczas wirowania (lub ultrawirowania) w roztworach o gradientie gęstości, np. chlorku cezu w obecności bromku etydydny. W taki sposób tradycyjnie oddziela się

genomowe DNA bakterii od plazmidowego DNA. Do oddzielenia kwasów nukleinowych o różnej długości możemy również wykorzystać wirowanie w odpowiednio dobranym buforze zawierającym różne ilości glikolu polietylenowego.

Metody chromatograficzne rozdziału kwasów nukleinowych pod względem długości cząsteczek oparte są na zastosowaniu różnego rodzaju złożeń chromatograficznych – sit molekularnych. Generalną zasadą jest tu fakt, że im dłuższa cząsteczka tym szybciej „wypłygnie” ze złoża. Techniki te mają obecnie coraz mniejsze znaczenie i powoli przechodzą do historii.

Podstawową techniką rozdziału kwasów nukleinowych jest w tej chwili elektroforeza. Możemy przeprowadzać ją bezpośrednio w roztworze – jest to elektroforeza swobodna. Przykładem jej zastosowania jest elektroforeza kapilarna kwasów nukleinowych.

Najbardziej powszechne i podstawowe techniki separacji kwasów nukleinowych względem ich wielkości (długości) opierają się na wykorzystaniu techniki elektroforezy w nośnikach: żelu agarozowym i żelu poliakryloamidowym. Elektroforeza DNA w agarozie i poliakryloamidzie wykorzystuje fakt, że kwasy nukleinowe są polianionami. Dysocjacja elektrolityczna reszt kwasu ortofosforowego w roztworach (buforach) elektroforetycznych powoduje, że kwasy nukleinowe posiadają stały ładunek na jednostkę długości, a w związku z tym ich wędrówka w danym nośniku i w danych warunkach zależy od długości cząsteczki oraz od jej kształtu (konformacji).

Technika elektroforezy w agarozie pozwala na rozdział cząsteczek DNA w przedziale od ok. 50 000 par zasad (pz), czyli 50 kpz, do ok. 100 pz. W ostatnich latach coraz powszechniej stosuje się bardziej zaawansowaną metodę elektroforezy DNA w agarozie tzw. elektroforezę pulsacyjną. W technice tej zamiast dwóch elektrod mamy ich wiele (4–8), ułożonych symetrycznie wokół żelu (np. 6 elektrod w kształcie heksagonalnym), a warunkami elektroforezy steruje procesor i odpowiednio dobrane programy. W technice tej możliwy jest rozdział bardzo dużych cząsteczek DNA o wielkości od 50 kpz do powyżej 2–3 Mpz. Można nią oddzielić od siebie poszczególne cząsteczki DNA chromosomowego eukariontów.

Do rozdziału małych (krótkich) cząsteczek kwasów nukleinowych stosowana jest elektroforeza w żelu poliakryloamidowym. Dobierając odpowiednio stężenie i parametry żelu możemy rozdzielać fragmenty DNA od kilku par zasad do ok. 1–2 kpz. Stosując specjalną wersję metody tzw. elektroforezę denaturującą możemy oddzielić od siebie nici DNA różniące się długością nawet o jeden nukleotyd. Technika ta była wykorzystywana w „starych” metodach sekwencjonowania cząsteczek DNA. Oznaczenie wielkości (długości) rozdzielonych cząsteczek DNA (RNA) odbywa się poprzez porównanie ruchliwości elektroforetycznej fragmentu DNA (lub RNA) w stosunku do tzw. standardów długości. Są to zwykle dostępne komercyjnie mieszaniny różnych fragmentów DNA lub RNA o precyzyjnie określonych długościach.

6.3.1. Rozdział elektroforetyczny DNA oraz produktów jego enzymatycznej degradacji w 0,8% agarozie

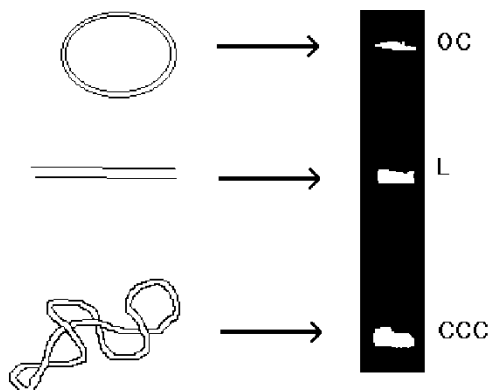
Zasada metody

Elektroforeza w żelu agarozowym jest standardową metodą do rozdzielania, identyfikacji, a także oczyszczania DNA i jego fragmentów. Pasma DNA po elektroforezie są lokalizowane w żelu poprzez obserwację w świetle ultrafioletowym fluorescencji bromku etydyny wbudowanego w podwójną spiralę kwasu nukleinowego. Metoda ta pozwala wykryć obecność nawet tak małych ilości DNA jak 1 ng na pasmo. Szybkość wędrówki DNA w agarozie podczas elektroforezy zależy od: 1) wielkości cząsteczki (szybkość wędrówki DNA przez żel agarozowy jest odwrotnie proporcjonalna do długości cząsteczek), 2) stężenia agarozы, 3) konformacji DNA, 4) napięcia prądu elektrycznego.

stężenie agarozы w żelu [%]	zakres rozdziału liniowych molekuł DNA (kb)*
0,3	5–60
0,6	1–20
0,9	0,5–7
1,2	0,4–6
2,0	0,1–3

* 1 kb(p) jest to długość liniowej cząsteczki DNA równa 1 000 par zasad azotowych. Jest to skrót bezpośrednio przeniesiony z terminologii anglojęzycznej *kilo base (pair)*. Polskim odpowiednikiem są skróty: pz (par-zasad) lub kpz (kilo-par-zasad).

Rozdział elektroforetyczny trzech form DNA o takim samym ciężarze cząsteczkowym, lecz różniących się przestrzenną strukturą cząsteczki (na przykładzie DNA plazmidu pBR322) został przedstawiony na Rys 6.7. Szybkość migracji liniowych fragmentów DNA jest proporcjonalna do napięcia tylko dla jego stosunkowo niskich wartości, dlatego więc do otrzymania najlepszego rozdziału fragmentów większych niż 2 kbp nie należy przekraczać napięcia 5V/cm. Zachowanie DNA w elektroforezie w żelu agarozowym nie zależy w istotny sposób od składu zasad azotowych. Szybkość poruszania się fragmentów DNA w agarozie nie zmienia się w dość szerokim zakresie temperatur (od 4°C do 30°C), w związku z tym wygodniej jest prowadzić ten proces w temperaturze pokojowej. Technika ta służy do rozdzielania kwasów nukleinowych, kompleksów białek z kwasami nukleinowymi oraz dużych struktur białkowych. Zależnie od wielkości rozdzielanych struktur stosuje się odpowiednie stężenie agarozy, z czym wiąże się stopień (gęstość) jej usieciowania. Agarozą jest polimerem polisacharydowym, utworzonym przez pochodne galaktozy. Elektroforezę przeprowadza się w pH ok. 7,0; w tych warunkach cząsteczki DNA są ujemnie naładowane, wędrują więc do anody.



Rys.6.7 Schemat rozdzielania elektroforetycznego trzech różnych form plazmidu pBR322 (widok znacznie powiększony)

CCC – cząsteczki koliste, kowalencyjnie zamknięte (ang. covalently closed circles) zwinięte w formę superhelikalną; OC – formy koliste powstające po wprowadzeniu co najmniej jednego nacięcia do jednej z nici DNA, wchodzącej w skład cząsteczki (ang. open circles); L – cząsteczki liniowe powstające w wyniku przecięcia obu nici DNA w tym samym miejscu

Postępowanie

Procedura przygotowania 0,8% żelu agarozowego

1. Odważyć 0,8 g agarozy i wsypać do kolby stożkowej na 500 ml.
2. Wziąć 100 ml buforu **10 × TBE** i uzupełnić H₂O do 1 litra – mamy 1 litr buforu elektrodowego.
3. Do kolby z agarozą dodać 100 ml buforu elektrodowego, zamieszać, zakryć folią i rozpuścić agarozę w kuchenke mikrofalowej (ok. 3–4 minut).
4. Dobrze wymieszać, pozostawić do schłodzenia do temp. ok. 55°C i dodać kroplę roztworu bromku etydyny, zamieszać.
5. Na idealnie poziomej powierzchni przygotować płytkę do agarozy wstawioną w rynienkę, ustawić grzebień. Ponieważ aparaty do elektroforezy w agarozie różnią się od siebie pod względem kształtu i sposobu przygotowania żelu, stosuje się różne modyfikacje tej procedury. Np. samą płytkę do agarozy zaklejamy taśmą samoprzylepną z obu końców przed wstawieniem grzebień i wleciem agarozy. Po zastygnięciu agarozy delikatnie odklejamy taśmę samoprzylepną (zwykle po wyciągnięciu grzebień).
6. Wlać agarozę na płytkę, zostawić do stężenia.
7. Wstawić płytkę z agarozą do aparatu do elektroforezy, wlać bufor elektrodowy.

Przygotowanie i nanoszenie próbek

Uwaga! Maksymalna objętość próbki do nanoszenia wynosi 55 µl ze względu na objętość pojedynczej „studzienki” do nanoszenia próbek. W tej objętości musi być co najmniej 1/5 objętości tzw. „stopera” do agarozy (buforu do nanoszenia). Tak więc możliwa objętość do „zagospodarowania” wynosi maksymalnie 9/10 pojemności pojedynczej studzienki. Osobom nanoszącym próbki po raz pierwszy sugerujemy maksymalne zwiększenie ilości dodanego buforu do nanoszenia – gęstość próbki jest wtedy większa i próbka jest bardziej „bezpieczna” – ryzyko złego naniesienia i wypłynięcia próbki jest mniejsze. Najwygodniej nanosi się próbki na żel (w aparacie) stojącym na równym i ciemnym tle. Próbkę nanosimy siedząc wygodnie, z łokciami opartymi o blat stołu laboratoryjnego, jedną ręką trzymając pipetę automatyczną, podczas gdy palcami drugiej dłoni podtrzymujemy (prowadzimy) pipetę.

1. Delikatnie (!!!) wyciągamy grzebień z agarozy.
2. Próbkę nanosimy „podwarstwiając” do studzienek wypełnionych buforem elektrodowym.
3. Elektroforezę prowadzimy przy odpowiednim natężeniu prądu dla danego aparatu do elektroforezy. Żel **musi** (!!!) być całkowicie zakryty buforem.
4. Elektroforezę prowadzimy zwykle 1–2 godz.
5. Wynik rozdzielania elektroforetycznego oglądamy w świetle UV. Należy bezwzględnie zakładać maskę ochronną.
6. Przy dłuższych manipulacjach z włączoną lampą UV należy ubrać rękawiczki, fartuch ochronny powinien mieć opuszczone rękawy.

Materiały i odczynniki

- bufor 10 × TBE: 0,89 M Tris, 0,89 M kwas borowy, 0,02 M EDTA
- “stoper” do agarozy: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50% glicerol, 2,5% SDS, 25 mM EDTA, 0,05% błękit bromofenolowy
- agarozą
- standard masy DNA (opcjonalnie)

6.3.2. Enzymatyczna degradacja kwasów nukleinowych

Kwasy nukleinowe mogą ulegać fragmentacji pod wpływem różnych czynników. Czynniki chemiczne takie jak stężone kwasy: mrówkowy czy chlorowy (VII) hydrolizują DNA i RNA do zasad azotowych. Część z zasad azotowych ulega jednak w takich warunkach destrukcji. Inkubacja RNA przez 1 godz. w 100°C w roztworze 1 M HCl lub H₂SO₄ powoduje jego hydrolizę do zasad purynowych i nukleozydów pirymidynowych.

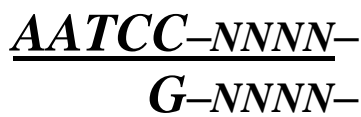
W organizmach żywych kwasy nukleinowe ulegają degradacji na drodze enzymatycznej. Proces ich hydrolizy katalizowany jest przez specyficzne enzymy. Enzymy degradujące kwasy nukleinowe katalizują proces hydrolizy wiązania estrowego pomiędzy resztą kwasu fosforowego a pentozą. W zależności od ich specyficzności działania (hydrolizy) powodują przerwanie nici kwasu nukleinowego od strony grupy 3’ lub 5’ pentozy. Powoduje to, że tak powstały koniec w miejscu 3’ lub 5’ może „mieć” grupę hydroksylową lub resztę kwasu fosforowego. Enzymy trawiące (fragmentujące) możemy podzielić na kilka grup w zależności od sposobu działania i specyficzności względem rodzaju i formy kwasu nukleinowego. Enzymy trawiące zarówno DNA jak i RNA generalnie nazywamy nukleazami. Enzymy trawiące wyłącznie DNA nazywamy deoksyrybonukleazami lub DNazami. Z kolei rybonukleazy lub RNazy trawią wyłącznie RNA. Ze względu na lokalizację miejsc hydrolizy kwasów nukleinowych przez enzymy możemy je podzielić na endonukleazy (hydrolizują wiązanie estrowe wewnątrz) oraz egzonukleazy (hydrolizują wiązanie estrowe „odcinając” zewnętrzny nukleotyd). Egzonukleazy mogą mieć specyficzność względem 3’ końca (3’>5’ egzonukleazy) lub względem 5’ końca (5’>3’ egzonukleazy). Egzonukleazy (podobnie jak endonukleazy) mogą wykorzystywać jako substrat kwas nukleinowy w postaci jedno lub dwuniciowej.

Endonukleazy mogą degradować (przecinać) kwas nukleinowy w sposób niespecyficzny (niezależny od sekwencji) lub w sposób specyficzny rozpoznając określoną sekwencję (np. enzymy restrykcyjne). Przykładem endodeoksyrybonukleazy jest DNAza I, przykładem endorybonukleazy może być RNAza A. Są to dwie najbardziej znane niespecyficznie działające nukleazy.

Klasycznym przykładem endodeoksyrybonukleazy (endoDNAzy) może być enzym restrykcyjny *Eco* RI. Jest to enzym występujący w niektórych szczepach bakterii z grupy *E. coli* (np. szczep BS5) rozpoznający sekwencję dwuniciowego DNA złożoną z sześciu par zasad:



rozcinający łańcuch kwasu nukleinowego jednej nici pomiędzy guaniną a adeniną, natomiast w drugiej nici pomiędzy dwiema guaninami (N – oznacza dowolny nukleozyd). Produktem pojedynczego trawienia cząsteczki DNA przez *Eco* RI są dwie cząsteczki DNA posiadające komplementarne odcinki jednoniciowe – tzw. lepkie końce:



Nie wszystkie enzymy restrykcyjne przecinają rozpoznawaną sekwencję DNA niesymetrycznie. Są enzymy restrykcyjne, które przecinają sekwencję DNA symetrycznie generując tzw. tępe końce. Przykładami takich enzymów mogą być: Dra I lub Alu I rozpoznające i trawiące odpowiednio sekwencje:



Przykłady innych enzymów restrykcyjnych generujących tzw. tępe końce to Pvu II (CAG CTG), Sma I (CCC GGG) czy Ssp I (AAT ATT).

6.3.3. Degradacja wysokocząsteczkowego DNA różnymi ilościami DNAzy

Zasada metody

DNAza I jest enzymem endonukleolitycznym specyficznym względem dwuniciowego DNA. Wysokocząsteczkowy DNA jest degradowany (trawiony) przez DNAzę I na coraz mniejsze fragmenty w miarę czasu trwania reakcji lub dostępności enzymu. Jako rezultat trawienia uzyskujemy mieszaninę fragmentów DNA o różnej wielkości (długości), które w elektroforezie w żelu agarozowym mogą układać się w postaci zabarwienia ścieżki nawet na całej jej długości (ang. *smear* – czasteczki DNA „rozsmarowane” po całej długości ścieżki).

Postępowanie

1. Przygotować próby zawierające poszczególne składniki mieszaniny reakcyjnej w ilości podanej w tabeli.

n r	DNAza I	bufor inkubacyjny	DNA substrat
1	DNAza bez rozcieńczenia 20 µl (=200 ng)	30 µl	3 µl
2	DNAza rozcieńczona 10 × 20 µl (=20 ng)	30 µl	3 µl
3	DNAza rozcieńczona 100 × 20 µl (=2 ng)	30 µl	3 µl
4	kontrola (bez DNAzy) 0 µl	50 µl	3 µl

2. Wszystkie próby inkubować 10 minut w temp. 37°C, po czym dodać 10 µl „stopera”
3. Wszystkie próbki (całość roztworu) nanieść na żel agarozowy (uprzednio pokryć żel cienką warstwą buforu elektrodowego).
4. Elektroforezę prowadzić przez ok. 1 godz. przy 40 mA / żel.
5. Pasma DNA po elektroforezie lokalizować w żelu przez obserwację w świetle ultrafioletowym fluorescencji bromku etydyny wbudowanego w podwójną spiralę kwasu nukleinowego.

Materiały i odczynniki

- DNAza I (1 mg/100 ml), czyli 10 µl (= 100 ng)
 - bez rozcieńczenia: 5 µl (=50 ng)
20 µl (=200 ng)
 - rozcieńczona 10 razy: 100 µl (= 1 000 ng) + 0,9 ml buforu inkubacyjnego
10 µl (= 10 ng)
5 µl (= 5 ng)
20 µl (= 20 ng)
 - rozcieńczona 100 razy: 100 µl (= 100 ng) + 0,9 ml buforu inkubacyjnego
10 µl (=1 ng)

5 μ l (=0,5 ng)

20 μ l (=2 ng)

- DNA chromosomowy (roztwór o stężeniu 1 mg/ml)
- bufor elektrodowy **TBE**: 54 g Tris base, 27,5 g kwasu borowego i 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) uzupełnić do 1 l wodą destylowaną; **Uwaga!** do elektroforezy rozcieńczyć 5-krotnie
- roztwór 0,8% agarozy w buforze elektrodowym (5-krotnie rozcieńczonym, z dodatkiem bromku etydyny)
- bufor do inkubacji z DNAzą: 20 mM Tris-HCl o pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 10% glicerol
- odczynnik przerywający reakcję enzymatyczną („stoper”): 20% sacharoza, 2% SDS, 5 mM EDTA, błękit bromofenolowy (0,5 mg/ml), pH 8,0

6.3.4. Analiza trawienia DNA plazmidowego enzymem restrykcyjnym *Eco* RI

Zasada metody

Enzym restrykcyjny jest endodeoksyrybonuklazą specyficzną względem określonej sekwencji DNA. Ilość miejsc trawienia w danej cząsteczce DNA zależy od ilości powtórzeń sekwencji DNA trawionej przez enzym. Jeśli w cząsteczce DNA nie występuje taka sekwencja to taki DNA nie będzie trawiony. Jeśli enzymem restrykcyjnym trawimy populację jednakowych cząsteczek DNA (np. plazmidowy DNA pBR322 lub DNA faga λ) to po rozdzielaniu w elektroforezie w agarozie uzyskujemy wyraźnie zdefiniowane pasma DNA.

Postępowanie

1. Przygotować próbkę badaną zawierającą: 2–5 μ l DNA plazmidowego (0,5–2,0 μ g DNA), 2 μ l buforu H, 1 μ l enzymu restrykcyjnego (*Eco* RI); uzupełnić do 20 μ l wodą bidestylowaną. Przygotować próbkę kontrolną nie zawierającą enzymu restrykcyjnego. Próby inkubować 1–2 godz. w temp. 37°C.
2. Po inkubacji całość próbek nanieść na 0,8% żel agarozowy i poddać elektroforezie.
3. Żel obserwować w świetle ultrafioletowym.

Materiały i odczynniki

- 2–5 μ l DNA plazmidowego (0,5–2,0 μ g DNA)
- Enzym restrykcyjny *Eco* RI
- bufor **H**: 50 mM Tris-HCl o pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol
- enzym restrykcyjny
- „stoper” do agarozy

6.4. IZOLACJA DNA Z KOMÓREK BAKTERYJNYCH

W komórce prokariotycznej DNA występuje w cytoplazmie w postaci pojedynczego, kolistego chromosomu bakteryjnego, zwanego genoforem, wielkości od 300 kb do 5 000 kb. Genofor nosi kompletną informację o budowie i funkcjonowaniu komórek bakteryjnych, a w obrębie genów bakteryjnych nie wyróżnia się intronów.

Poza chromosomem bakterie posiadają także w cytoplazmie kolisty DNA plazmidowy, który niesie dodatkowe informacje nie będące konieczne do funkcjonowania komórek bakteryjnych, korzystne jednak dla bakterii, takie jak: oporność na antybiotyki np. gen kodujący laktamazę rozkładającą ampicylinę, właściwości chorobotwórcze, zdolność wykorzystywania innych źródeł energii, np. gen β -galaktozydazy, kodujący enzym umożliwiający trawienie galaktozy. DNA plazmidowy niesie także informację o płci bakterii.

Informację genetyczną wirusów mogą stanowić: dwuniciowy DNA różnej długości w zależności od wirusa, posiadający także obszary niekodujące; jednoniciowy DNA lub RNA.

6.4.1. Otrzymywanie DNA chromosomowego z *E. coli*

Zasada metody

Bakterie do preparacji DNA genomowego hodujemy ok. 6 godz. w 37°C na pożywce stałej lub w pożywce płynnej z wytrząsaniem. Ściany komórkowe usuwamy inkubując bakterie z lizozymem, komórki lizujemy przy

użyciu detergentu – 25% SDS. RNA jest usuwany przez hydrolizę w pH 8,0. Białka i lipidy usuwamy z lizatu poprzez ekstrakcję do mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamyłowego. DNA o dużej masie cząsteczkowej (DNA chromosomowy) wytrącamy z roztworu zimnym etanolem i nawijamy na bagietkę szklaną.

Postępowanie

Hodowla na podłożu stałym

1. Na trzy płytki Petriego ze stałą pożywką pełną wysiewamy 2 ml zawiesiny bakterii w logarytmicznej fazie wzrostu, rozprowadzamy głaszczką i inkubujemy 6 godz. w 37°C.
2. Kolonie bakterii zawieszamy za pomocą głaszczki w małej ilości 0,9% NaCl (**II**) i przenosimy pipetką pasteurowską do probówek wirówkowych.
3. Zawiesinę komórek wirujemy 5 minut, $3\ 000 \times g$ w +4°C, supernatant odrzucamy.

Hodowla na podłożu płynnym

1. 0,5 l bulionu zaszczipiamy hodowlą *E. coli* w stosunku 1:50.
2. Bakterie hodujemy 6 godz. w 37°C z wytrząsaniem.
3. Hodowlę wirujemy 5 minut, $3\ 000 \times g$ w +4 °C, supernatant odrzucamy.
4. Osad bakterii z punktu 3 zawieszamy w 12,5 ml buforu (**III**) i przenosimy do kolbki.
5. Do zawiesiny dodajemy 5 mg lizozymu (**VIII**), dokładnie mieszamy i inkubujemy 30 minut w 37°C.
6. Dodajemy 1 ml 25% SDS (**IV**) i delikatnie mieszamy kolistym ruchem.
7. Do lizatu dodajemy 3,5 ml 5 M NaCl (**I**) i 17 ml mieszaniny chloroform : alkohol izoamyłowy (24:1, v/v) (**V**) i wytrząsamy przez 30 minut.
8. Całość wirujemy 10 minut, $10\ 000 \times g$ w +4°C.
9. Pipetą pasteurowską zbieramy fazę wodną (roztwór DNA genomowego bakterii) i mierzymy jej objętość cylindrem, a następnie przenosimy do zlewki.
10. Dodajemy podwójną objętość zimnego etanolu (**VI**) i delikatnie mieszamy kolistym ruchem.
11. Wytrącony DNA nawijamy delikatnie na bagietkę szklaną, a następnie rozpuszczamy w małej ilości buforu (**VII**) (w najmniejszej objętości buforu, w której rozpuści się DNA).
12. Uzyskany preparat DNA chromosomowego *E. coli* przechowujemy w –20°C.

Materiały i odczynniki

- **I.** 5 M NaCl
- **II.** 0,9% NaCl
- **III.** bufor o pH 8,0: 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA
- **IV.** 25% SDS
- **V.** mieszanina: chloroform : alkohol izoamyłowy (24:1 v/v)
- **VI.** 99% etanol (– 20 °C)
- **VII.** bufor o pH 7,4: 0,15 M NaCl, 0,015 M cytrynian sodu
- **VIII.** lizozym – ok. 5 mg

6.4.2. Izolacja DNA plazmidowego

Zasada metody

W zasadowym roztworze izoosmotycznym glukozy (roztwór **I**) zawieszamy komórki bakterii. Dodanie na tym etapie preparacji lizozymu dla zhydrolizowania ścian komórek bakterii, jak podają niektóre przepisy, jest niekonieczne. Dodając SDS i NaOH dokonujemy zasadowej lizy komórek, przy czym EDTA z roztworu **I** chroni lizat przed działaniem uwolnionych endogennych enzymów. W punkcie 6. Postępowania, po odwirowaniu mieszaniny roztworów **I** i **II**, zawieszamy lizat w roztworze **III** –następuje zobojętnienie środowiska zasadowego, DNA rozpuszcza się w roztworze. Dodając propanol wytrącamy z roztworu kwasy nukleinowe. Po rozpuszczeniu osadu DNA w wodzie, dodając 0,1 objętości octanu sodu i podwójną objętość etanolu, ponownie wytrącamy DNA plazmidowy w celu dalszego oczyszczenia preparatu.

Postępowanie

1. Pojedynczą kolonię bakteryjną wysiewamy do 3 ml pożywki LB z odpowiednim antybiotykiem i inkubujemy, wytrząsając, przez noc w 37°C.
2. Nalewamy po 1,5 ml hodowli do probówek Eppendorfa i wirujemy 30 sekund przy $12\ 000 \times g$ w 4°C.
3. Supernatant odrzucamy, a osad bakterii suszymy w probówce przez odsączenie roztworu na bibule.
4. Osad zawieszamy w 100 μ l schłodzonego do 4°C roztworu **I** i pozostawiamy kilka minut w lodzie. **Uwaga!** Osad bakterii musi być na tym kroku preparacji bardzo dobrze zawieszony w roztworze **I**, co można uzyskać przez energiczne wytrząsanie.
5. Dodajemy 200 μ l świeżo przygotowanego roztworu **II** i pozostawiamy ok. 15 minut na lodzie. **Uwaga!** Po dodaniu roztworu **II** próby nie można energicznie mieszać ani wytrząsać aby nie porozrywać zdenaturowanego DNA.
6. Dodajemy 150 μ l schłodzonego do 4°C roztworu **III**, delikatnie mieszamy i pozostawiamy 30 minut w lodzie.
7. Zawiesiny wirujemy 5 minut przy $12\ 000 \times g$ w 4°C.
8. Supernatant przenosimy do nowych probówek i dodajemy 400 μ l propanolu, trzymamy w lodzie 1 godz.
9. Wirujemy 5 minut przy $12\ 000 \times g$ w 4°C.
10. Supernatant odrzucamy, a osad rozpuszczamy w 200 μ l H₂O; dodajemy 20 μ l octanu sodu i 400 μ l etanolu, pozostawiamy ok. 30 minut w -20°C.
11. Próby wirujemy 5 minut przy $12\ 000 \times g$ w 4°C; supernatant odrzucamy, osad suszymy w wirówce próżniowej i rozpuszczamy w 100 μ l H₂O.
12. Uzyskany wodny roztwór plazmidowego DNA przechowujemy w -20°C.

Materiały i odczynniki

- roztwór **I**: 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM glukoza, 10 mM EDTA ; wszystkie składniki buforu rozpuścić w ok. 90 ml wody, doprowadzić stężonym HCl do pH 8,0 i uzupełnić wodą do 100 ml
- roztwór **II**: 0,2 M NaOH (2 ml 10 M NaOH), 1% SDS (0,5 ml 20% SDS); dopełnić wodą do 10 ml; roztwór przygotować na świeżo z wyjściowych roztworów: 10 M NaOH i 20% SDS
- roztwór **III**: zmieszać 60 ml 5 M octanu potasu; 11,5 ml lodowatego kwasu octowego i 28,5 ml H₂O
- 99% etanol
- 99% propanol
- 3 M octan sodu

6.5. PREPEARACJA KWASU RNA Z DROŻDZY

Postępowanie

1. W kolbie stożkowej na 50–200 ml doprowadzić do wrzenia 15 ml buforu do ekstrakcji.
2. Do wrzącego roztworu dodać 10 g dobrze rozdrobnionych świeżych drożdży i ogrzewać zawartość przez 3 minuty.
3. Zawiesinę schłodzić pod strumieniem zimnej wody z kranu, a następnie w łaźni wodno-lodowej o temp. 4°C.
4. Odwirować zawiesinę przez 10 minut przy $3\ 000 \times g$.
5. Uzyskany supernatant wlać do dwóch objętości oziębionego 95% etanolu i inkubować w zamrażarce 30 minut.
6. Preparat odwirować ($3\ 000 \times g$; 10 minut; 4°C).
7. Uzyskany osad rozpuścić w 5 ml 0,01 M roztworu NaOH.
8. Określić ilość wypreparowanego RNA poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm.
9. Określić stopień czystości wypreparowanego RNA przez wykreślenie widma absorpcyjnego w zakresie od 230 nm do 300 nm i obliczenie stosunku A_{260}/A_{280} . Do pomiarów spektrofotometrycznych roztwór RNA należy rozcieńczyć (ok. 100 razy).

Materiały i odczynniki

- świeże drożdże piekarskie (10 g na jedną preparację)
- bufor ekstrakcyjny o składzie: 25 mM bufor fosforanowy (wyłącznie fosforany sodowe), pH 7,0, 2% SDS i 4,5% etanol