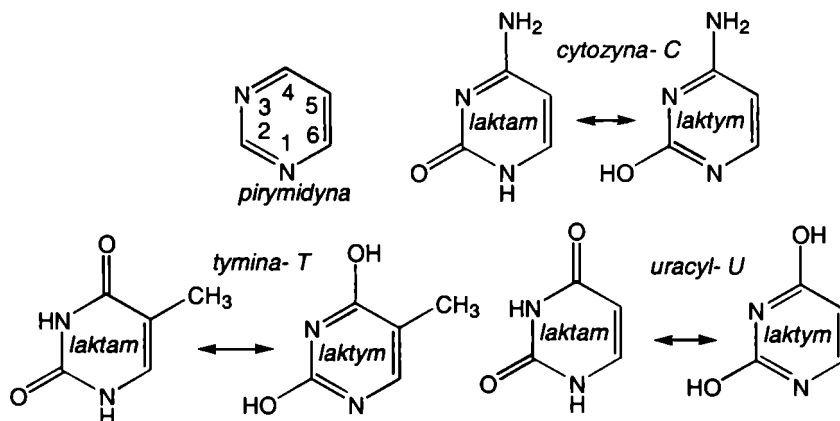


7. KWASY NUKLEINOWE

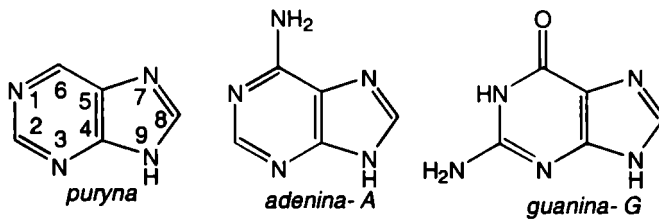
7.1. Ogólne właściwości kwasów nukleinowych

Kwasy nukleinowe (RNA i DNA) tworzą łańcuchy zbudowane z nukleotydów połączonych wiązaniami fosfodiesterowymi. W skład kwasów nukleinowych wchodzi cztery rodzaje zasad: adenina, guanina, cytozyna i tymina (DNA) lub uracyl (RNA), cukier deoksyryboza (DNA) lub ryboza (RNA) oraz reszty kwasu fosforowego.

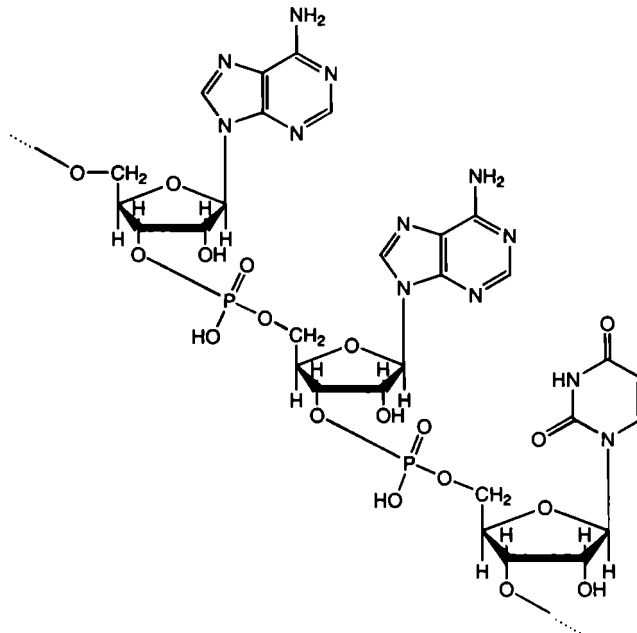
Poza zbliżoną budową chemiczną RNA i DNA różnią się wieloma cechami. DNA zazwyczaj występuje w postaci długiej, nierozgałęzionej podwójnej helisy, w której nukleotydy jednego łańcucha są połączone w pary wiązaniami wodorowymi z nukleotydami drugiego łańcucha, przy czym adenina zawsze wiąże się z tyminą a guanina z cytozyną (zasada komplementarności). RNA występuje zwykle w postaci jednoniciowej i tworzy krótsze od DNA polimery. Dodatkowa grupa hydroksylowa obecna w pierścieniu rybozy, a niewystępująca w pierścieniu deoksyrybozy czyni ponadto RNA bardziej podatnym na hydrolizę. DNA stanowi materiał genetyczny większości organizmów i części wirusów (wyjątkiem jest genom niektórych wirusów, zbudowany z RNA). Funkcja RNA jest związana głównie z biosyntezą białek choć istnieją również regulatorowe RNA, które biorą udział w regulacji procesów transkrypcji, translacji czy degradacji transkryptów.



Zasady pirymidynowe: związki heterocykliczne wchodzące w skład kwasów nukleinowych, DNA (tymina, cytozyna) i RNA (uracyl, cytozyna).



Zasady purynowe (adenina i guanina): związki heterocykliczne wchodzące w skład kwasów nukleinowych.



Schemat struktury kwasu rybonukleinowego (RNA). Zasady purynowe (adenina, guanina) i pirymidynowe (cytozyna, uracyl) związane są z resztami rybozylowymi wiązaniem N-glikozydowym. Między resztami rybozylowymi występuje wiązanie fosfo-diesterowe.

ZAGADNIENIA DO OPRACOWANIA:

- Budowa chemiczna kwasów nukleinowych – nukleozydy, nukleotydy, postulatory Watsona i Cricka, struktury superhelikalne, DNA A, B, Z.
- Funkcja DNA i różnych typów RNA.
- Cykl życiowy retrowirusów.
- Enzymy restrykcyjne – ich funkcja fizjologiczna oraz zastosowanie.
- Elektroforeza kwasów nukleinowych – zasada rozdziału, sposoby barwienia.
- Metody sekwencjonowania kwasów nukleinowych.
- Wektory jako narzędzia biologii molekularnej – rodzaje i budowa.

- Reakcja PCR.
- Mechanizm replikacji – enzymy biorące w niej udział.
- Zasady wszystkich wykonywanych na ćwiczeniach oznaczeń.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA:

- *Biochemia*. Berg J M., Tymoczko J L., Stryer L. (red.), PWN, Warszawa 2005 – rozdziały 4, 6 i 31.
- *Genetyka molekularna*. Węgleński P., PWN, Warszawa 2006 – rozdziały: „DNA budowa i właściwości” oraz „Rekombinowanie i klonowanie DNA”.

7. 2. Izolacja genomowego DNA z linii komórkowych

ZASADA:

Głównym celem izolacji jest uzyskanie maksymalnej ilości wysokocząsteczkowego, genomowego DNA przy jednoczesnym zachowaniu odpowiednich parametrów dotyczących czystości uzyskanego preparatu. Dotychczas opisano wiele różnych metod izolacji DNA, jednak każda procedura składa się z następujących etapów: liza komórek celem uzyskania jąder komórkowych; odbiałczanie odbywające się zwykle poprzez ekstrakcję fenolem i chloroformem; wytrącanie DNA poprzez dodanie 0,1 objętości 3 M octanu amonu i 1 objętości izopropanolu lub przez dodanie 2,5 objętości etanolu; przemywanie osadu DNA 70% alkoholem etylowym.

WYKONANIE:

Do komórek zebranych w 2 ml próbówce typu Eppendorf dodać 100 µl sterylnego PBS. Po dokładnym zawieszeniu komórek (przez 5-krotne pipetowanie pipetą automatyczną) dodać 400 µl tiocyjanianu guanidyny (GTC) i pipetować kilkakrotnie do uzyskania klarownego roztworu o gęstej konsystencji. Następnie dodać:

1. 500 µl fenolu
2. 100 µl mieszaniny chloroform-alkohol izoamylowy (49:1).

Całość dokładnie wymieszać poprzez wielokrotne pipetowanie. W następnym etapie preparaty odwirować (10 min, 14 000 obr./min) celem rozdzielenia fazy wodnej i organicznej. Fazę wodną zebrać do czystej próbówki typu Eppendorf i dodać 500 µl alkoholu izopropylowego. Po odwirowaniu (10 min, 14 000 obr./min) przemyć osad dwukrotnie 70% alkoholem etylowym. Po wysuszeniu osadu DNA (inkubacja w 37 °C, 5–10 min) zawiesić osad w 50 µl sterylnej wody.

Bufor GTC: 4 M izotiocyjanian guaniny, 25 mM cytrynian sodu pH 7,0, 0,5% sarkozyl, 0,1 M 2-merkaptoetanol.

7. 3. Izolacja całkowitego RNA z linii komórkowych

ZASADA:

Celem izolacji jest otrzymanie całkowitego RNA z komórek eukariotycznych. Uzyskane RNA może być następnie użyte do hybrydyzacji typu „Northern”, odwrotnej transkrypcji, przygotowania bibliotek cDNA czy translacji *in vitro*.

WYKONANIE:

UWAGA: aby uchronić izolowane RNA przed działaniem RNaz należy pracować w rękawiczkach, używając wyłącznie autoklawowanych końcówek i probówek. Całą procedurę przeprowadzać na lodzie.

Z szalki hodowlanej zlać pożywkę, przepłukać komórki 1 ml roztworu PBS i usunąć go. Bezpośrednio na szalkę dodać 300 µl buforu GTC i umieścić ją na lodzie. Końcówką pipety dokładnie zdrapać komórki z powierzchni naczynia, przenieść do probówki typu Eppendorf i kilkakrotnie pipetować. Do lizatu komórkowego dodać:

1. 30 µl 2 M octanu sodu (pH 4,0);
2. 300 µl fenolu (pH 4,0);
3. 80 µl mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (49:1).

Pipetować 10 razy. Inkubować na lodzie 15 min. Odwirować mieszaninę przez 5 min, 14 000 obr./min, w temperaturze 4°C. Po wirowaniu zebrać górną fazę wodną, unikając zaciągnięcia fazy dolnej i przenieść do nowej probówki. W celu precypitacji RNA dodać 300 µl izopropanolu i wymieszać przez kilkakrotne odwracanie probówki. Odwirować mieszaninę przez 15 min, 14 000 obr./min w temperaturze 4°C i zlać nadsącz. Osad przemyć dodając 300 µl 70% etanolu i odwirować przez 3 min, 14 000 obr./min w 4°C. Usunąć nadsącz bardzo dokładnie, a osad wysuszyć poprzez pozostawienie otwartej probówki przez 10–15 min, w temperaturze pokojowej. Osad rozpuścić w 30 µl wody wolnej od RN-az.

Uzyskane RNA należy przechowywać w temperaturze -20 °C.

Bufor GTC: 4 M izotiocyanian guaniny, 25 mM cytrynian sodowy pH 7,0; 0,5% sarkozyl, 0,1 M 2-merkaptoetanol.

7.4. Ocena ilościowa preparatów DNA i RNA

Określić stężenie DNA i RNA na podstawie pomiaru absorbancji przy 260 nm. Ponieważ absorbancja roztworu RNA o stężeniu 40 µg/ml wynosi około 1, stężenie RNA w badanej próbce można obliczyć ze wzoru:

$$[\text{RNA}]_{\mu\text{g/ml}} = A_{260} \times 40 \times \text{rozcieńczenie}$$

Ponieważ absorbancja roztworu DNA o stężeniu 50 µg/ml wynosi około 1, stężenie DNA w badanej próbce można obliczyć ze wzoru:

$$[\text{DNA}]_{\mu\text{g/ml}} = A_{260} \times 50 \times \text{rozcieńczenie}$$

Na otrzymaną wartość stężenia mają wpływ również inne związki, które mogą stanowić zanieczyszczenie preparatu i pochłaniają światło w podobnym zakresie, dlatego należy dodatkowo zmierzyć absorbancję badanej próbki przy długości fali 230 i 280 nm. Dla czystego preparatu RNA lub DNA stosunek A_{230}/A_{260} i A_{260}/A_{280} powinien znajdować się w przedziale 1,8–2. Niższa wartość współczynnika świadczy o zanieczyszczeniu fenolem, a wyższa – białkami.

Przygotować 1 ml 200-krotnie rozcieńczonego preparatu w wodzie destylowanej, zmierzyć absorbancję przy 230, 260 i 280 nm, a następnie obliczyć stężenie i ocenić czystość preparatu.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Obliczyć stężenie otrzymanych preparatów DNA i RNA na podstawie pomiaru absorbancji, a następnie ocenić ich czystość.

7.5. Elektroforeza DNA

ZASADA:

Standardową metodą rozdzielania, identyfikacji i oczyszczania DNA jest elektroforeza w żelach agarozowych lub poliakryloamidowych. W buforach o pH w zakresie od 7,5 do 7,8, w których prowadzi się rozdział elektroforetyczny reszty fosforanowe kwasów nukleinowych są zdysocjowane i posiadają ładunek ujemny. Ponieważ jedna reszta fosforanowa przypada na pojedynczy nukleotyd, stosunek ładunku do masy jest wielkością stałą. W tych warunkach prędkość migracji cząsteczek DNA zależy od:

- ich wielkości – prędkość migracji cząsteczek jest odwrotnie proporcjonalna do logarytmu z ich masy cząsteczkowej;
- stężenia żelu – do rozdzielania fragmentów DNA o wielkości 0,5–20 kbp (kilo par zasad) można zastosować 0,8% żel agarozowy;
- różnicy potencjałów między elektrodami.

Zaletą opisywanej metody jest możliwość bezpośredniej lokalizacji rozdzielanych fragmentów DNA. Żel oraz bufor do elektroforezy zawierają bromek etydyny, substancję wiążącą się do DNA, która wykazuje fluorescencję w UV. Dzięki temu można w świetle UV śledzić przemieszczanie się poszczególnych prążków DNA podczas prowadzenia elektroforezy.

WYKONANIE:

Przygotowanie żelu: w celu przygotowania 0,8% żelu agarozowego należy rozpuścić 0,8 g agarozy w 100 ml 10 × rozcieńczonego buforu TBE (1 × stężony bufor TBE), a następnie podgrzać w kuchence mikrofalowej. Po schłodzeniu, do roztworu dodać 5 µl bromku etydyny (10 mg/ml). Całość wylać na przygotowaną uprzednio tackę z grzebieniem i poczekać aż żel zastygnie.

Przygotowanie preparatu: Do próbki typu Eppendorf starannie odpipetować 1 µl buforu obciążającego i 2 µl DNA o stężeniu 0,5 µg/µl.

Rozdział w żelu: Umieścić przygotowany żel w aparacie do elektroforezy napelnionym buforem TBE. Nałożyć próbki na żel i prowadzić rozdział pod napięciem 80V przez 30–45 min.

10 × stężony bufor TBE:

- 0,89 M Tris
- 0,89 M kwas borowy
- 0,02 M EDTA, pH 8,0

6 × stężony bufor obciążający:

- 15% fikor
- 0,25% błękit bromofenolowy
- 0,25% cyjanoksylen

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Obejrzyć żel na transiluminatorze w świetle UV i ocenić jakość DNA: poziom degradacji i stopień zanieczyszczenia białkami.

7.6. Elektroforeza RNA w warunkach denaturujących

ZASADA:

Metoda ta pozwala na łatwy rozdział jednoniciowego RNA. Można dzięki niej sprawdzić jakość (stopień degradacji) wyizolowanego RNA. Elektroforeza RNA stanowi też pierwszy etap analizy typu „Northern blotting”. Po rozdzieleniu RNA zostaje przeniesiony na membranę nylonową lub nitrocelulozową i poddany analizie poprzez hybrydację ze znakowanymi sondami.

WYKONANIE:

Przygotowanie żelu: Aby przygotować 1% żel agarozowy z formaldehydem należy rozpuścić 1 g agarozy w 73 ml wody destylowanej z dodatkiem 10 ml buforu $10 \times$ MOPS ($2 \times$ rozcieńczony bufor $20 \times$), podgrzewając w kuchenke mikrofalowej. Następnie należy schłodzić agarozę do około 55°C , dodać 16,7 ml 37% formaldehydu, wymieszać i wylać na przygotowaną uprzednio tackę z grzebieniem. Umieścić pod dygestorium i poczekać aż żel zastygnie.

Przygotowanie preparatu:

Włączyć blok grzejny i ustawić temperaturę 65°C . Przygotować 7 μl roztworu zawierającego RNA z oczyszczonej próbki i dodać 7 μl buforu obciążającego. Znając stężenie otrzymanego preparatu obliczyć ilość RNA (w ng) nałożonego na żel. Inkubować przygotowaną próbkę w bloku grzejnym, w temperaturze 65°C , przez 10 min. Przenieść RNA na lód.

Rozdział w żelu:

Umieścić przygotowany żel w aparacie do elektroforezy napełnionym 20 razy rozcieńczonym roztworem MOPS ($1 \times$ stężony MOPS). Nałożyć próbki na żel i prowadzić rozdział pod napięciem 80V przez 30–45 min. Obejrzeć żel na transiluminatorze w świetle UV i ocenić jakość RNA: poziom degradacji i stopień zanieczyszczenia genomowym DNA.

$20 \times$ stężony bufor MOPS:

- 0,4 M MOPS (pH 7,0)
- 80 mM octan sodu
- 20 mM EDTA (pH 8,0)

$2 \times$ stężony bufor obciążający do RNA:

- 56% (o/o) formamid
- 0,4 M formaldehyd
- $2 \times$ stężony bufor MOPS
- 80 $\mu\text{g/ml}$ bromek etydyny
- 200 $\mu\text{g/ml}$ błękit bromofenolu

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Obejrzeć żel na transiluminatorze w świetle UV i ocenić jakość RNA: poziom degradacji i stopień zanieczyszczenia białkami.