

5 NUKLEOVÉ KYSELINY

Nukleové kyseliny určujú genetické vlastnosti živej hmoty, ovplyvňujú jej organizáciu a reprodukciu. Predstavujú látku, ktorá nesie informáciu pre vznik a priebeh všetkých životných procesov, preto stoja v hierarchii látok potrebných pre existenciu živej hmoty najvyššie.

Existujú dve triedy nukleových kyselín, ktoré delíme podľa sacharidovej zložky mononukleotidov na: deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA).

DNA je nositeľkou dedičnosti vo všetkých bunkových formách života a v mnohých vírusoch, pričom plní dve funkcie:

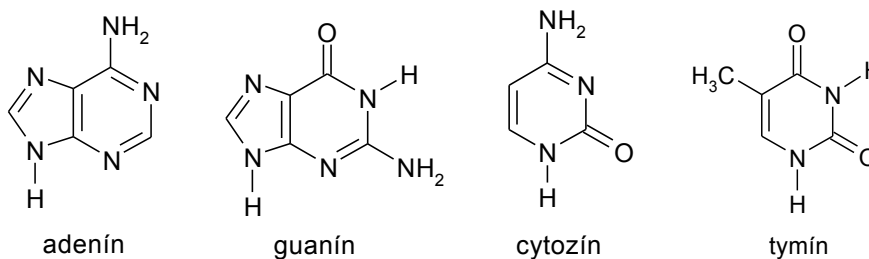
- riadi vlastnú replikáciu počas delenia bunky,
- riadi transkripciu za vzniku komplementárnych molekúl RNA.

RNA má viacero biologických funkcií:

- mediátorová RNA (mRNA) riadi ribozomálnu syntézu polypeptidov (translácia),
- ribozómová RNA (rRNA) má štruktúrnú a funkčnú úlohu,
- transferová RNA (tRNA) prenáša aminokyseliny na ribozóm počas syntézy proteínov,
- niektoré RNA sa spájajú so špecifickými proteínmi do ribonukleoproteínov, ktoré sa potom zúčastňujú posttranskripčných úprav iných RNA,
- v mnohých vírusoch je RNA nositeľkou genetickej informácie namiesto DNA (hovoríme o tzv. RNA vírusoch).

Zloženie a štruktúra DNA

Molekula **DNA** sa skladá zo štyroch báz, a to **adenínu (A)**, **guanínu (G)**, **cytozínu (C)** a **tymínu (T)**, ďalej z **2-deoxyribózy** a **kyseliny fosforečnej**. Okrem štyroch základných báz môže DNA obsahovať aj takzvané minoritné bázy ako sú napríklad 5-metylcytozín, 5-hydroxymetyluracil a N-6-metylguanín. Molekula DNA obsahuje rovnaký počet adenínových a tymínových báz (A–T) a tak isto rovnaký počet guanínových a cytozínových báz (G–C). Tieto pravidlá sú známe ako Chargaffove pravidlá, ktoré v roku 1949 popísal Erwin Chargaff.

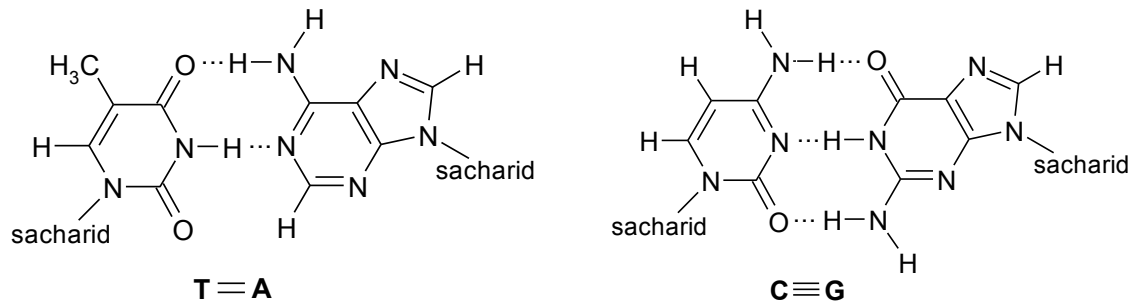


Molekula DNA tak ako každá makromolekula, je charakterizovaná okrem primárnej štruktúry aj sekundárnou a terciárnou štruktúrou. Určenie tejto štruktúry DNA *Jamesom Watsonom* a *Francisom Crickom* s využitím údajov röntgenovej analýzy uskutočnenej *Rosalindou Franklin* a *Maurice Wilkinsom* je často označované ako zrod modernej molekulovej biológie.

Watson-Crickova štruktúra B-DNA má tieto hlavné vlastnosti:

1. Skladá sa z dvoch polynukleotidových reťazcov, vinúcich sa okolo spoločnej osi v smere pohybu hodinových ručičiek a tvoria tak pravotočivú dvojzávitnicu (*double helix*) o priemere asi 2 nm. Tieto dva reťazce majú opačný smer a vinú sa jeden okolo druhého. Bázy vytvárajú jadro dvojzávitnice a ich fosfosacharidové reťazce sa vinú po okraji.
2. Roviny báz sú takmer kolmé na os dvojzávitnice. Každá báza je spojená vodíkovými mostíkmi s bázou protiľahlého reťazca za vzniku rovinného páru báz.
3. Ideálna dvojzávitnica B-DNA má 10,6 párov báz na závit (oblúk dvojzávitnice 36° na jeden pár) a stúpanie závitú dvojzávitnice 3,46 nm.

Vodíkové väzby, ktoré stabilizujú takúto štruktúru sa môžu vytvárať vždy len medzi určitými bázami, a to medzi adenínom a tymínom a medzi guanínom a cytozínom. Dvojica A–T sa páruje dvoma vodíkovými väzbami a dvojica G–C troma vodíkovými väzbami. Sekvencia v jednom reťazci dvojzávitnice je komplementárna (doplnková) k sekvencii v druhom reťazci dvojzávitnice, to znamená, že báza jedného reťazca sa môže párovať len s takou bázou, s ktorou môže vytvoriť vodíkové väzby (A=T a G≡C, **obrázok 5.1**).

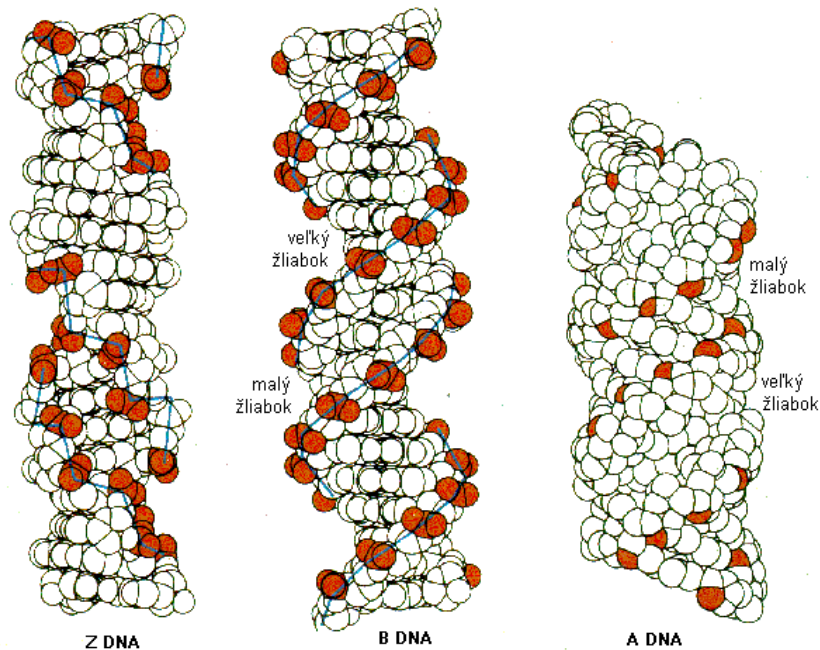


Obrázok 5.1 Vznik vodíkových väzieb medzi bázami v molekule DNA.

Párovanie báz, pri ktorom vznikajú dve vodíkové väzby medzi adenínom a tymínom a tri vodíkové väzby medzi guanínom a cytozínom je jedným z faktorov, ktoré vplyvajú na stabilitu molekuly DNA. Okrem vodíkových väzieb, dvojzávitnicu DNA stabilizujú i $\pi - \pi$ elektrónové interakcie báz, ktoré závisia od vzájomného prekrytia kruhov (*stacking interactions*). Ďalšími stabilizačnými faktormi sú:

- van der Waalsove sily medzi susednými bázami;
- záporne nabitú molekulu kyslíka, ktoré vytvárajú vodíkové väzby s molekulami vody alebo s histónmi;
- špecifické enzýmy a regulačné proteíny, ktoré sa pohybujú v širokých a úzkych žliabkoch DNA;
- superhelixy, ktoré vytvárajú molekuly DNA.

Dvojzávitnice DNA existujú vo viacerých formách, z ktorých sú najznámejšie tieto tri: **A-DNA**, **B-DNA** (obe sú pravotočivé) a **Z-DNA** (ľavotočivá). Dvojzávitnica typu B (s vertikálnym rozostúpením 3,4 nm medzi nukleotidovými bázovými rovinami a s 10,5 spárovanými bázami na jedno otočenie) je vo vodnom prostredí stabilnejšia ako typ A, preto sa DNA v bunkách vyskytuje prevažne ako B forma (väčšina úsekov jednej DNA je ako B forma, niektoré úseky môžu mať aj štruktúru A formy alebo štruktúru ľavotočivej Z formy). Pri znížení obsahu vody na 75 % (vysoká koncentrácia solí a nízky stupeň hydratácie), prechádza B forma do konformačného usporiadania A. Túto formu charakterizuje pravotočivá dvojzávitnica s priemerom 2,55 nm, v ktorej majú nukleotidové bázové roviny rozostúpenie 2,46 nm s 11 spárovanými bázami na jedno otočenie. Z-DNA je ľavotočivá dvojzávitnica s priemerom 1,84 nm s rozostúpením bázových rovín 4,56 nm, na ktorý pripadá 12 párov báz. Nukleové kyseliny sú za fyziologických podmienok silne nabitú polyanióny s distribúciou jedného záporného náboja na fosfát. V nukleozóme je iba polovica DNA náboja neutralizovaná kladne nabitými nábojmi histónových proteínov. Veľký podiel na neutralizácii DNA, a tým aj stabilizácii má hydratácia a zložky intracelulárneho prostredia, z ktorých dominantné postavenie majú kationy Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ .



Obrázok 5.2 Typy dvojzávitnicovej molekuly DNA: **Z**, **B** a **A**.

Dvojzávitnica DNA sa môže vyskytovať ako:

1. **lineárna molekula** – dvojreťazcová DNA s voľnými koncami 5' a 3'.
2. **kruhovú molekulu** – spojitá dvojreťazcová DNA bez voľných koncov. Kruhovú molekulu môže prejsť do superhelikálnej konformácie. Touto konformáciou rozumieme zvinutie DNA v priestore. DNA nevyznačujúca sa superhelikálnym vinutím sa označuje ako relaxovaná.
 - **kovalentne uzavretá kružnica (ccc)** – dvojzávitnicová DNA, ktorá nemá voľné konce ani zlom v reťazcoch. Môže sa vyskytovať v superhelikálnej alebo relaxovanej forme.
 - **otvorená kružnica (oc)** – relaxovaná dvojzávitnica má aspoň jeden zlom v jednom z reťazcov.

Kruhovú molekulu DNA je typická pre plazmidovú, mitochondriálnu a chloroplastovú DNA, a tiež je prítomná v prokaryotických bunkách, kde tvorí genóm mnohých vírusov a baktérií. **cccDNA** sa odlišuje od lineárnej formy tým, že sa v nej môže indukovať superhelikálne pnutie a je často označovaná aj ako **superhelikálna DNA (scDNA)**. Superhelikálna DNA má v porovnaní s relaxovanou formou (cccDNA) stav s vyššou termodynamickou energiou, ktorá je súčtom energetických príspevkov potrebných na ohyb a priestorové stáčanie molekuly. Superhelikálne vinutie vedie k zvýšeniu reaktivity DNA s proteínmi alebo s inými molekulami, ktoré interagujú s DNA.

Topológia superhelikálnej DNA

Topologické izoméry sú molekuly superhelikálnej DNA, ktoré sa líšia celkovým číslom vinutia **Lk**. Pri superhelikálnom usporiadaní môže os dvojzávitnice vytvárať ľavotočivé alebo pravotočivé závitky. Superhelikálna DNA môže mať dve základné podoby, ktoré sú z topologického hľadiska ekvivalentné a môžu medzi sebou navzájom prechádzať. Sú to:

- pravotočivý, ľavotočivý solenoid,
- pravotočivá, ľavotočivá dvojité nadzávitnice (superhelix).

Kruhovú molekulu a ich topológiu je možné charakterizovať pomocou topologických parametrov:

- **Tw** (twisting number) udáva počet otočení jedného reťazca okolo osi dvojzávitnice

- **Wr** (writhing number) udáva počet prekrížení jedného reťazca druhým v priestore. Hodnoty čísel Wr a Tw nemusia byť celočíselné a nie vždy sa dajú presne určiť.
- **Lk** (linking number) – celkové číslo vinutia. Nadobúda celočíselné hodnoty pre absolútny počet helikálnych otáčok cccDNA. Z toho vyplýva, že celkový počet závitov cccDNA sa nemôže meniť a akákoľvek zmena v počte otáčok v rámci molekuly musí byť vykompenzovaná zmenou počtu superhelikálnych otáčok, takže platí:

$$Lk = Tw + Wr \quad \text{alebo} \quad \Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr.$$

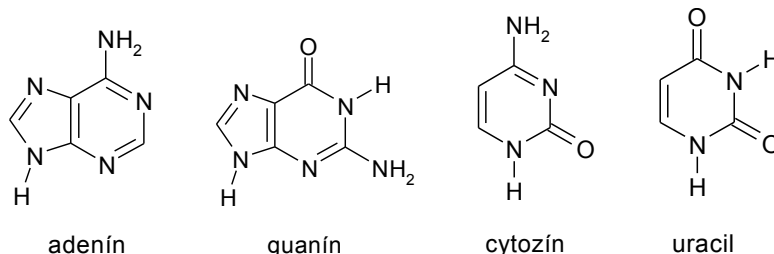
Tvorbu superhelixov, ale aj iné interakcie molekúl DNA reguluje osobitná skupina enzýmov, ktoré sa nazývajú **topoizomerázy**. Z viacerých tried topoizomeráz sú najlepšie preštudované topoizomerázy typu I a II, ktoré sú označené podľa počtu polynukleotidových reťazcov, ktoré štiepia. V závislosti od topologických vlastností ich môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

- 1. topoizomerázy I:** premiestňujú jeden neporušený reťazec cez zlom protíľahlého reťazca v dvojzávitnici. Týmto príspevom sa mení superhelikálne vinutie kruhových molekúl o násobky 1.
- 2. topoizomerázy II:** premiestňujú neporušenú dvojzávitnicu DNA cez zlomy oboch reťazcov protíľahlej dvojzávitnice. Týmto príspevom sa mení superhelikálne vinutie kruhových molekúl o násobky 2.

Topoizomerázy III: z hľadiska mechanizmu patria medzi topoizomerázy typu I. **Topoizomerázy IV:** spolu s gyrázou sa zaraďujú medzi topoizomerázy typu II. **Reverzná gyráza:** patrí medzi atypické topoizomerázy, prítomné v termofilných a hypertermofilných organizmoch. Základná funkcia katalyzovaná týmto enzýmom *in vitro* je produkcia pozitívnych superhelikálnych otáčok v cccDNA, v termodynamicky nevýhodnej reakcii, riadenej ATP. Prítomnosť pozitívneho superhelikálneho vinutia stabilizuje dvojzávitnicu pri vysokých teplotách.

Zloženie a štruktúra RNA

Molekula RNA sa tak isto ako DNA skladá zo štyroch báz, a to **adenínu (A)**, **guanínu (G)**, **cytozínu (C)** a **uracilu (U)**, sacharidovej zložky **ribózy** a **kyseliny fosforečnej**. Rovnako ako v molekule DNA sa i v molekule RNA nachádzajú minoritné bázy, ktorých je v molekule RNA viac ako v molekule DNA. Pre molekuly RNA neplatia Chargaffove pravidlá.

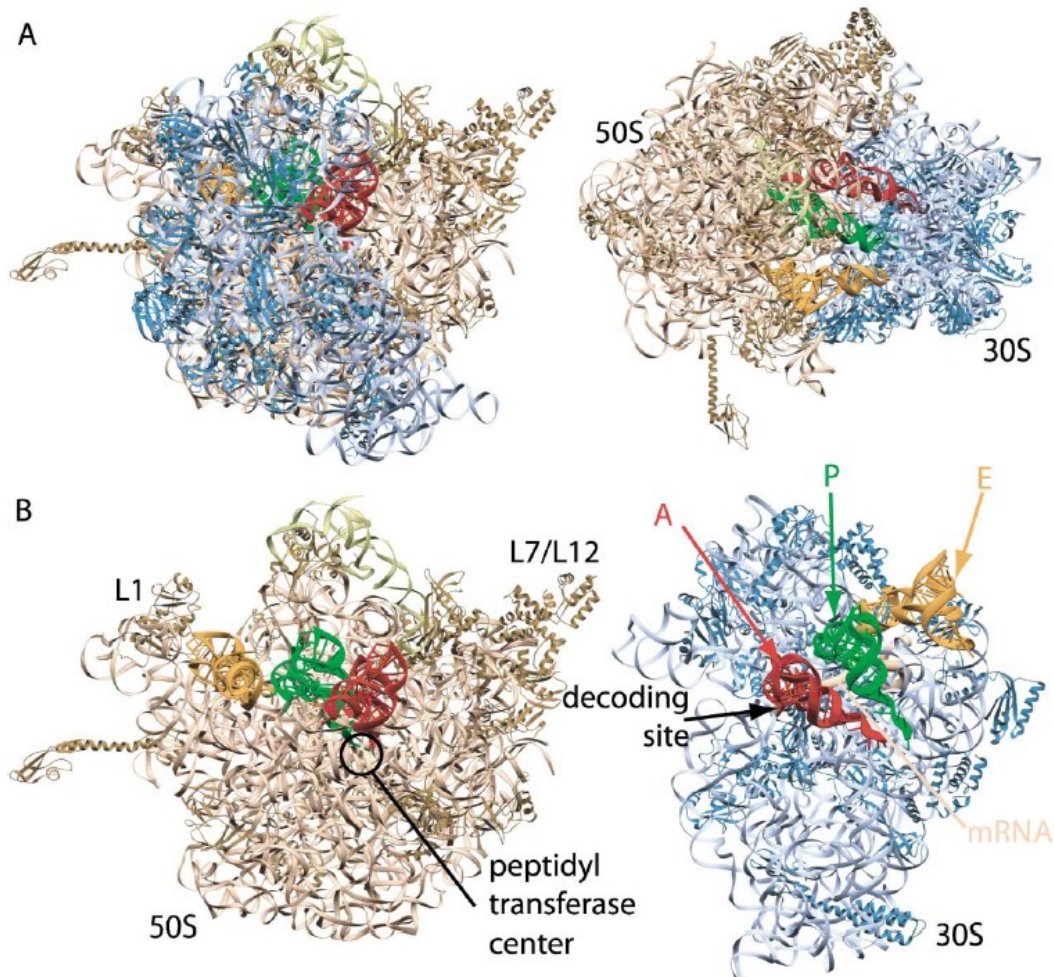


K základným typom RNA patrí:

- mediátorová RNA – **mRNA**,
- ribozómová RNA – **rRNA**,
- transferová RNA – **tRNA**,
- malá jadrová RNA – **snRNA**,
- vírusová RNA.

Mediátorová RNA sprostredkúva prenos genetickej informácie z DNA na proteíny. Jej veľkosť závisí od množstva prenášaných informácií. Syntéza mRNA prebieha ako negatívny (komplementárny) prepis poradia nukleotidov z molekuly DNA na molekulu RNA s tým rozdielom, že v RNA sa nenachádza tymín ale uracil. V eukaryotických bunkách sa na rozdiel od bakteriálnych najprv syntetizuje prekursor mRNA, ktorý prechádza mnohými úpravami. Pôsobením ribonukleáz sa molekula postupne skraca (vystrihujú sa **intróny** a ponechávajú sa **exóny**) a upravujú sa jej obidva konce. Tento proces úpravy sa nazýva **splicing**. Doba života mRNA je u kvasiniek niekoľko desiatok minút a u živočíchov niekoľko hodín.

Ribozómová RNA je stavebnou zložkou ribozómov a predstavuje až 90 % všetkých RNA. Ribozómy baktérií sa skladajú z troch rôznych rRNA, ktoré sa označujú podľa svojich sedimentačných konštánt (5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA). Ribozómy eukaryotických buniek obsahujú až štyri rôzne rRNA (5S rRNA, 5,8S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA). Ribozómy sú miestom, kde sa prekladá (translatuje) genetická informácia z molekuly mRNA do molekuly proteínu. Z funkčného hľadiska môžeme ribozómy považovať za multienzýmové komplexy, ktoré katalyzujú vznik peptidovej väzby. Ribozómy sa nachádzajú v cytoplazme, mitochondriách, chloroplastoch a v bunkovom jadre.



Obrázok 5.3 Kryštálová štruktúra ribozómu. Štruktúra 70S ribozómu zložená z 30S a 50S podjednotiek.

Transferová RNA. Biologickou funkciou tRNA je prenos aktivovaných aminokyselín pri proteosyntéze. Nachádza sa v cytoplazme. Každá tRNA môže prenášať len jednu aminokyse-

linu, preto bunka musí obsahovať minimálne toľko rozličných tRNA, koľko je prírodných (kódovaných) aminokyselín, ktoré sa zabudovávajú do proteínov. Každá tRNA obsahuje **akceptorové miesto** pre aminokyselinu, ktorú prenáša. Oproti akceptorovému miestu sa nachádza **antikodónová slučka**, ktorá obsahuje **antikodón**. Antikodón je triplet, ktorý pri proteosyntéze nadväzuje na príslušný **kodón** na molekule mRNA.

Najznámejšie funkcie RNA molekúl sú:

- prenos genetickej informácie vo forme **mRNA**;
- väzbu medzi mRNA a vznikajúcimi peptidmi sprostredkujú makromolekuly **tRNA**, ktoré sú "nabité" príslušnou aminokyselinou, čím vzniká aminoacyl-tRNA;
- **rRNA** je zložkou ribozómov, v ktorých prebiehajú translačné pochody;
- **vírusová RNA** prenáša genetickú informáciu RNA vírusov;
- **snRNA** sa zúčastňujú pri zostrihu "nezrelých" prekursorov mRNA (splicing), pri ich editácii, pričom dochádza k tomu, že genetická informácia DNA sa nezhoduje so vznikajúcim proteínom.

Možnosti štúdia nukleových kyselín

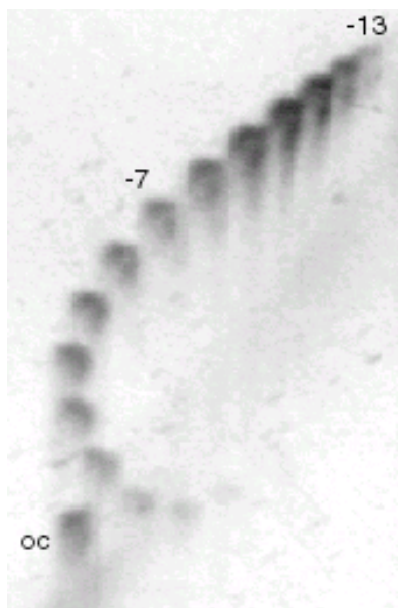
Na štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi sa využívajú rôzne techniky:

- **optické metódy** (absorpčná spektroskopia, fluorescenčná spektroskopia, Ramanova spektroskopia, kruhový dichroizmus)
- **mikroskopické metódy** (fluorescenčná mikroskopia, elektrónová mikroskopia, atómová silová mikroskopia)
- **hydrodynamické metódy** (izopyknická centrifugácia, sedimentácia)
- **kalorimetrické metódy** (izotermálna kalorimetria, diferenčná skenujúca kalorimetria)
- **elektroforetické metódy** (jednoduchá elektroforéza, dvojrozmerná elektroforéza, teplotná gradientová gélová elektroforéza)

Elektroforetické metódy sa používajú na separáciu látok, buniek a iných častíc, ktoré majú elektrický náboj. Elektroforéza sa často používa na štúdium bielkovín a nukleových kyselín. Elektroforetické delenie prebieha podľa pohyblivosti makromolekúl v elektrickom poli, ktoré závisí od: veľkosti náboja, sily elektrického poľa, veľkosti a tvaru makromolekúl a podmienok prostredia.

Veľkosť náboja molekuly ovplyvňuje stupeň ionizácie, pH a iónová sila. Elektroforetická pohyblivosť je funkciou náboja, ktorý nesie molekula, molekulovej hmotnosti a je závislá od tvaru, čiže konformácie. Touto metódou sa dajú úspešne sledovať interakcie typu nukleová kyselina-proteín, nukleová kyselina-nukleová kyselina a proteín-proteín. Elektroforéza prebieha v prostredí voľného elektrolytu, alebo v pórovitých nosičoch, ktoré sú nasýtené elektrolytom. Ako nosiče sa používajú škrob, dextran, agaróza a polyakrylamidové gély. V súčasnosti sa pri elektroforetickej separácii najviac používajú agarózové a polyakrylamidové gély. Elektroforéza v polyakrylamidovom géli (PAGE) sa využíva hlavne pri štúdiu proteínov a v malej miere aj nukleových kyselín s menšou molekulovou hmotnosťou. Polyakrylamidový gél bol pri elektroforéze prvýkrát použitý v roku 1959 *Raimondom* a *Weintraubom*. Popularita tohto nosiča je vďaka jeho priehľadnosti, mechanickej stabilite, chemickej inertnosti, stabilite v širokom rozsahu hodnôt pH a jeho nerozpustnosti vo väčšine rozpúšťadiel používajúcich sa pri elektroforéze. Gél môže byť spoľahlivo a reprodukovateľne pripravený z analyticky čistých východných materiálov, ktorých vzájomný pomer má rozhodujúci vplyv na hustotu a priemernú veľkosť pórov gélu. Koncentrácia akrylamidu býva v rozsahu od 3 do 30 %, čo umožňuje separovať látky od 10^2 do 10^6 g/mol, čo odpovedá peptidom s veľkosťou rádovo od jednej aminokyseliny do 10^2 prípadne až 10^3 aminokyselinových zvyškov.

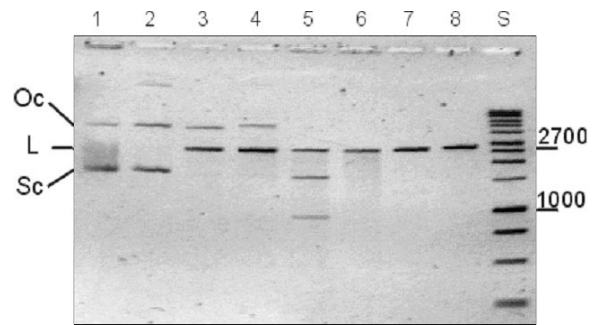
Na štúdium nukleových kyselín sa využíva **agarózová elektroforéza**. Plazmidová DNA sa v bunkách nachádza v početných topologických formách. Vo fyziologických podmienkach sa v dôsledku disociácie fosfátových skupín správa ako polyanión a pri elektroforéze putuje ku kladnej elektróde. V danom prostredí má zmes topoizomérov rovnaký náboj, a preto jediným faktorom, ktorý ovplyvňuje pohyblivosť topoizomérov je priestorová konformácia. Klasická gélová elektroforéza cirkulárnych molekúl je obmedzená deliacou schopnosťou gélu. Jednotlivé topoizoméry s molekulovou hmotnosťou menšou ako 7 kbp (kilobazopár) sa pozorujú pri 1 % agarózovom géli ako jednotlivé pásy.



Obrázok 5.5 Dvojrozmerná elektroforéza plazmidovej DNA (pUC 19).

méry v diagonálnom usporiadaní.

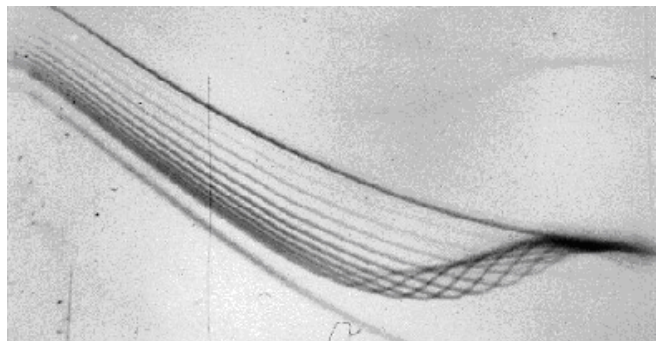
Teplotná gradientová gélová elektroforéza (TGGE) je vhodnou metódou na študovanie konformačných prechodov a stability plazmidovej DNA a na študovanie stability proteínov. TGGE sa prvýkrát použila pri analýze konformačných prechodov a pri sekvenčných variáciách nukleových kyselín v roku 1989. Pri tejto metóde sa využíva lineárny teplotný gradient, ktorý sa vytvára kolmo na smer pohybu makromolekúl. Teplotný gradient je vytvorený prostredníctvom medenej platne spojenjej s elektroforetickou aparátúrou zostave-



Obrázok 5.4 Jednoduchá agarózová elektroforéza (*Oc* – open circular, *L* – linear, *Sc* – supercoiled DNA).

Vyššie topoizoméry nad limitnou hodnotou W_r dávajú pri elektroforéze široký kontinuálny pás superhelikálnej DNA. Tento pás sa skladá z viacerých topoizomérov s rozličnou hodnotou W_r , ale nedokážu sa navzájom jednoznačne oddeliť.

Dvojrozmerná elektroforéza (2D elektroforéza) eliminuje určité nedostatky jednoduchej elektroforézy ako je napr.: nedostatočná deliaca schopnosť, vzájomný prekryv topoizomérov vplyvom štruktúrnych prechodov, komigráciu topologických neekvivalentov a maskovanie lineárnej DNA. Táto metóda umožňuje vypočítať niektoré topologické a termodynamické parametre, napr. zmenu W_r a odpovedajúci počet párov báz, ktoré prešli na alternatívnu štruktúru. Pri 2D elektroforéze sa v prvom smere molekuly rozdelia na základe kompaktného zbalenia a v druhom smere, (ktorý je kolmý na prvý), dochádza k separácii na základe konformačných zmien spôsobených prítomnosťou **interkalátora**. Význam interkalátorov pri 2D elektroforéze spočíva v relaxácii torzného pnutia indukovaného vplyvom superhelikálneho vinutia. Pri kontrolnej dvojrozmernéj elektroforéze, keď sa v druhom smere nemenia podmienky prvého smeru, získame topoizo-



Obrázok 5.6 Teplotná gradientová gélová elektroforéza plazmidovej DNA (pUC 19).

nou podľa návrhu *Riesnera*. Pri použití TGGE sa získa priama závislosť na teplote, a tým aj možnosť priamej konfrontácie experimentov s termodynamickými teóriami. Z pokusov TGGE je možné za pomoci štandardných postupov určiť termodynamické parametre (T_m , ΔG , ΔH , ΔS), ktoré podávajú informáciu o stabilite biopolyméru.

Príprava plazmidovej DNA

Kultivácia na tuhých agarových médiách: tuhé pôdy vhodné na kultiváciu v Petriho miskách obsahujú základné komponenty potrebné pre rast buniek (peptón, kvasinkový extrakt, NaCl) aj agar (max 1,5 % roztok). Jednotlivé komponenty sú rozpustené vo vode (pH 7,5) a vysterilizované. Po sterilizácii a ochladení na 55 °C sa pridávajú termolabilné komponenty (napr. antibiotiká) a vylievajú sa do sterilných Petriho misiek. Petriho misky s agarovými pôdami sa po naočkovaní príslušného bakteriálneho kmeňa, pomocou sterilnej bakteriálnej kľučky, kultivujú v obrátenej polohe (hore dnom) pri 37 °C v termostate. Bakteriálne kolónie sa môžu na agarových platniach uchovávať aj niekoľko týždňov v chladničke (pre dlhšie skladovanie bakteriálnych kmeňov sa využívajú glycerínové konzervy, ktoré sa môžu uchovávať aj niekoľko rokov).

Kultivácia v tekutých médiách: tekuté média sa pripravujú z Bacto-peptónu, Bacto-kvasinkového extraktu, NaCl a vody. Tieto zložky sa zmiešajú, upraví sa pH a sterilizujú sa (15 – 20 min) v autokláve alebo inej tlakovej nádobe. Po vysterilizovaní a ochladení sa pridá požadované antibiotikum a kolónia kmeňa, ktorý chceme kultivovať. Bakteriálne bunky kultivujeme v termostate pri teplote 37 °C. Na inokuláciu sa používa nočná bakteriálna kultúra alebo jedna kolónia z agarovej platne. Pretože všetky bunky, vrátane metabolických produktov, zostávajú počas celej doby kultivácie v uzavretom prostredí, je rast podmienený zmenami prostredia. Medzi ne patria hlavne vyčerpanie živín a nahromadenie odpadových produktov. Rýchlosť rastu bakteriálnej kultúry je najvhodnejšie zaznamenávať meraním optickej hustoty (OD) pri vlnovej dĺžke 600 nm.

Izolácia molekuly DNA: základným problémom pri izolácii nukleových kyselín je odstránenie proteínov a polysacharidov takým spôsobom, aby sa neporušila primárna a sekundárna štruktúra molekúl. Pri izolácii je dôležité najprv uvoľniť bunkový obsah rozrušením bunkovej steny a cytoplazmatickej membrány. Narušenie buniek môžeme uskutočniť mechanicky pomocou homogenizátorov, pomocou enzýmu lyzozýmu, ktorý rozkladá polysacharidy bunkovej steny a pomocou detergentov (dodecylsulfát sodný). Molekuly DNA zostávajú v roztoku, po centrifugácii sa vytráňajú izopropanolom. Zrazenina sa rozpustí a zvyšky proteínov sa odstraňujú roztokom fenol-chloroformu, ktoré sa vytráňajú na rozhraní organickej a vodnej vrstvy. Inou možnosťou odstránenia proteínov z nukleových kyselín sú detergenty, guanidínchlorid, vysoká koncentrácia solí alebo ich enzýmové odbúravanie proteázami. Z roztoku DNA sa ešte odstráni RNA pomocou RNázy, ktorá štiepi molekulu RNA (ak by sme chceli vyizolovať RNA, tak sa namiesto RNázy použije DNáza). Ďalšou možnosťou rozdelenia DNA a RNA je ultracentrifugácia v rovnovážnom hustotnom gradiente CsCl.

Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie nukleových kyselín: molekuly nukleových kyselín obsahujú purínové a pyrimidínové bázy, ktoré majú aromatický charakter a absorbujú ultrafialové žiarenie s vlnovou dĺžkou 200 – 300 nm. Pri spektrofotometrickom stanovení koncentrácie nukleových kyselín meriame absorbanciu pri 260 nm. Absorbancia s hodnotou 1 pri 260 nm odpovedá koncentrácii: 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri dvojvláknovej DNA,
40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri jednovláknovej DNA,
40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri molekule RNA,
20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri oligonukleotidoch.

Stanovenie čistoty nukleových kyselín: molekuly nukleových kyselín sú najčastejšie znečistené proteínmi, ktoré majú absorpčné maximum pri 280 nm. Pomer absorbancií pri

260 nm a pri 280 nm udáva čistotu nukleových kyselín. Ak je pomer 1,8 – 2,0 môžeme hovoriť o dostatočne čistej DNA alebo RNA.

Použitá literatúra

- Bates, A. D., Maxwell, A.: DNA topology, 2nd edition, Oxford University Press, 2005.
- Ferenčík, M., Škárka, B.: Biochémia, Slovak Academic Press, Bratislava 2000.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- Voet, D., Voet, J. G.: Biochemistry, 3rd edition, John Wiley & Sons, 2004.