



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

**ALKALMAZOTT BIOTECHNOLÓGIA ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI
TANSZÉK**

BIOKÉMIA LABOR

**5. MÉRÉS
NUKLEINSAVAK: DNS IZOLÁLÁS, ANALÍZIS**

**A JEGYZETET ÖSSZEÁLLÍTOTTA:
Czobor Ádám és Deák Veronika**

GYAKORLATVEZETŐ:

**Deák Veronika
H-1111, Budapest, Szent Gellért tér 4. CH ép. 3. em.
Tel: (1) 463-3857
Fax: (1) 463-3855
E-mail: deak@mail.bme.hu**

A laborfoglalkozásra kötelező kinyomtatva elhozni a jegyzet Gyakorlati részét (13-17. oldalak)

**BUDAPEST
2012**

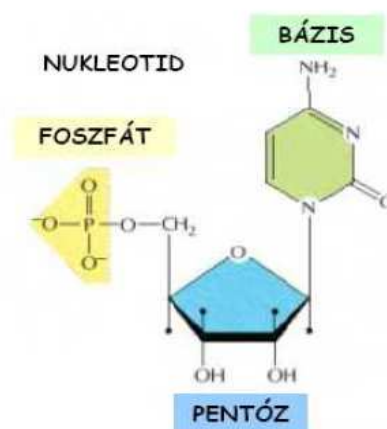
Elméleti bevezetés

A nukleinsavak szerkezete

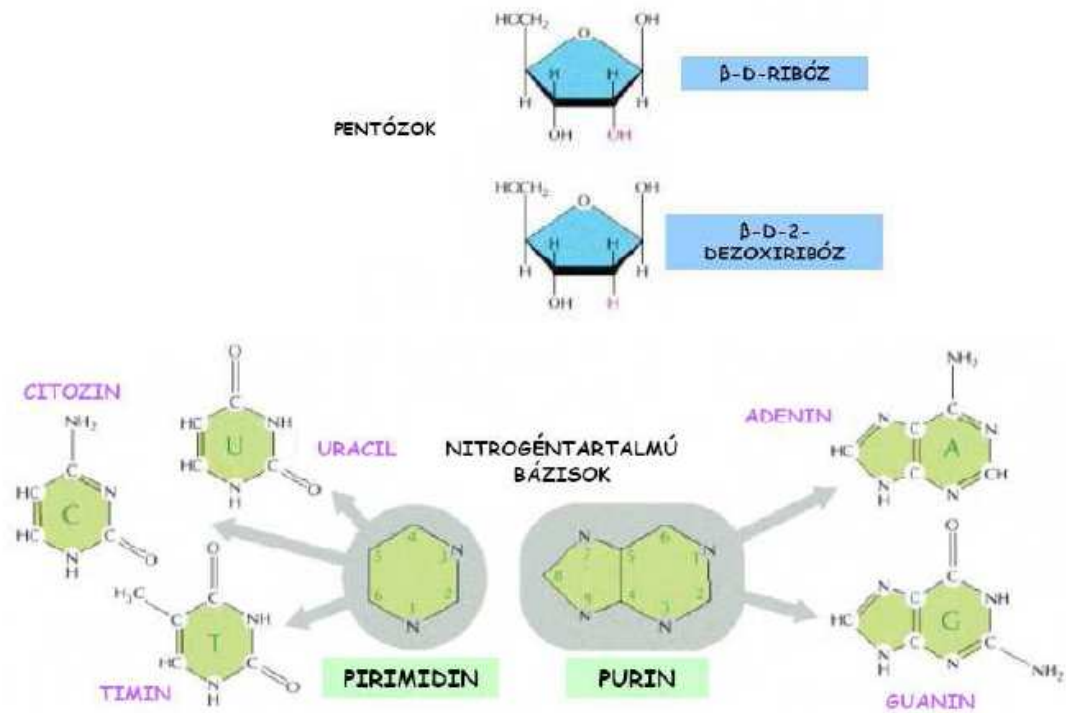
A nukleinsavak lineáris, el nem ágazó polimerek. Lúgos vagy enyhe savas hidrolízisük során **nukleotidok** szabadulnak fel (1. ábra). A nukleotidok tovább bonthatók **nukleozidokra** és **foszforsavra**. A nukleozidok további bontása révén 5 szénatomos, gyűrűs szénhidrátot **2'-dezoxiribózt** (dezoxiribonukleinsav/DNS esetén) vagy **ribózt** (ribonukleinsav/RNS esetén), illetve heterociklusos **purin- és pirimidin bázisokat** kapunk (2. ábra). A pirimidin bázisok a pirimidin származékai: citozin, uracil, timin (5-metil-uracil). A purin bázisok váza egy pirimidin- és egy imidazolgyűrű egyesülésével alakult ki. Puringyűrűt tartalmazó bázisok: **adenin** és **guanin**. A DNS **adenint**, **guanint**, **citozint** és **timint** tartalmaz, az RNS-ben *timin* helyett mindig **uracil** található.

A szabad nukleotidokban a foszforsav általában a cukormolekula 5'-OH csoportját észteresíti, a bázis pedig β -N-glikozidos kötéssel a cukormolekula 1'-szénatomjához kapcsolódik. A kötésben a purin bázis 9-es helyzetű N-atomjával, a pirimidin bázis pedig 3-as helyzetű N-atomjával vesz részt.

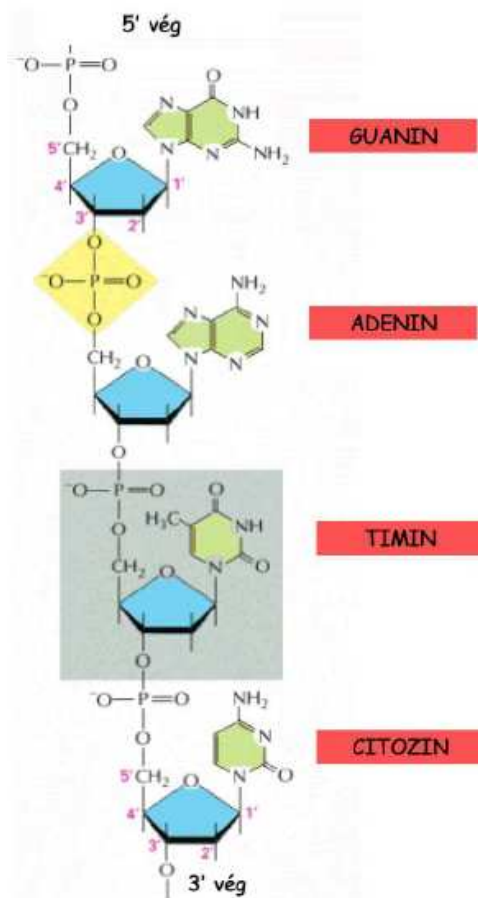
A nukleotid egységek **3'-5'-foszfodiészter-kötéssel** összekapcsolódva alkotják a **polinukleotid láncokat** úgy, hogy az egyik nukleotid dezoxiribózának 5'-hidroxilcsoportja egy foszfátcsoporton keresztül egy másik nukleotid cukoregységének 3'-hidroxilcsoportjához kapcsolódik (3. ábra).



1. ábra: A nukleotidok felépítése



2. ábra: A nukleotidokat alkotó cukormolekulák és nitrogéntartalmú szerves bázisok

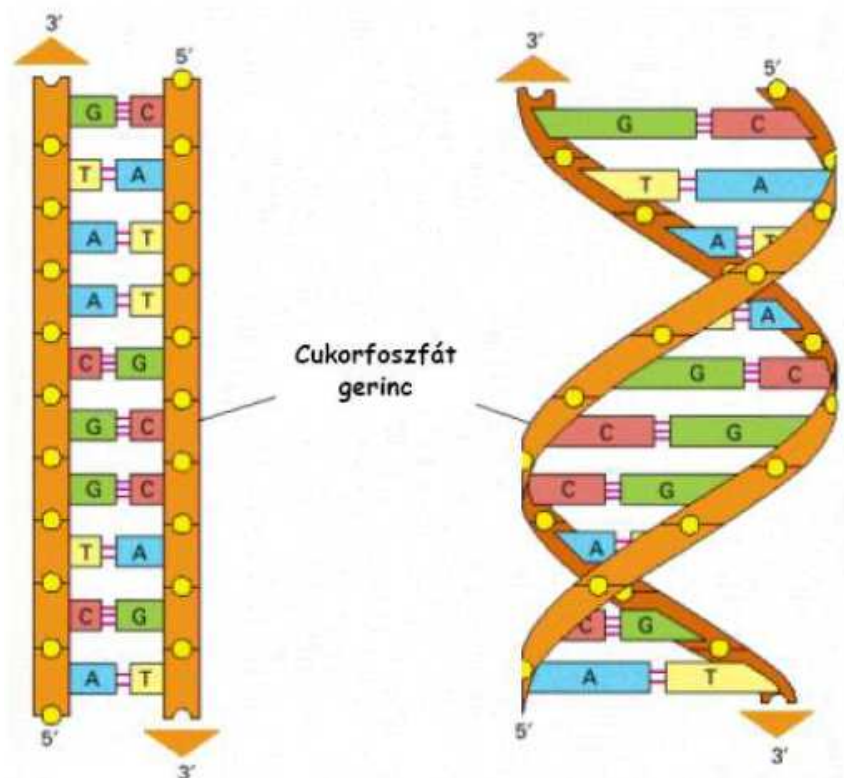


3. ábra: A polinukleotid lánc felépítése

A DNS **kettős spirál (kettős hélix)** szerkezetű (4. ábra). A kettős hélix modellt J. Watson és F. Crick hozta létre 1953-ban. Munkájuk során számos kutató, köztük R. Franklin, M. Wilkins és E. Chargaff eredményeire támaszkodtak. Franklin és Wilkins röntgendiffrakciós vizsgálatain révén bebizonyította, hogy a DNS két láncból épül fel. Chargaff és munkatársai pedig megállapították, hogy az egyes bázisok eltérő arányban fordulnak elő a különböző forrásokból származó DNS mintákban, de a pirimidin bázisok mennyisége mindig egyenlő a purin bázisok mennyiségével, valamint az A és T, illetve a G és C aránya 1:1.

Azaz $A=T$ és $G=C$, valamint $T+C$ (pirimidinek) = $G+A$ (purinok).

Watson és Crick eredeti Nature cikke, melyben először számoltak be a DNS kettős spirál szerkezetéről, a jegyzet mellékletében olvasható.



4. ábra: A DNS molekula szerkezete

A kettős hélix átmérője 2 nm, egy menet magassága 3,4 nm és kb. 10 bázispárból áll, a bázisok síkja egymástól 0,34 nm távolságra helyezkedik el. A kettős spirál külső részét képező cukorfoszfát-gerinc csavarulatai között két helikális árok helyezkedik el, a szélesebbet nagy ároknak (2,2 nm), a keskenyebbet kis ároknak (1,2 nm) nevezzük. Watson és Crick az ún. B-konformációjú, jobbmenetes DNS szerkezetet írta le.

A fenti (B) konformáción kívül A-DNS, C-DNS, és Z-DNS formák is léteznek.

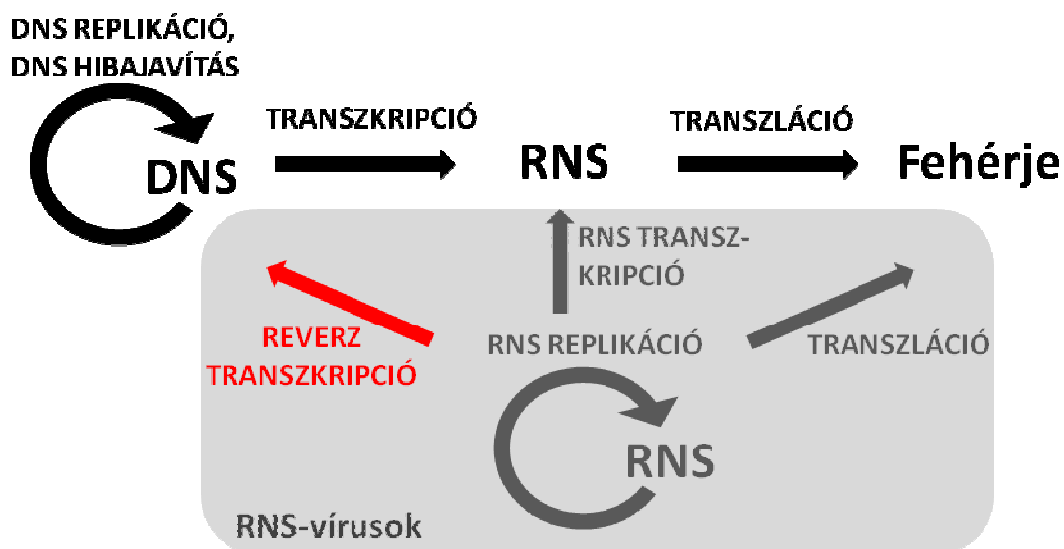
A nukleinsavak funkciója és elhelyezkedése a sejtekben

A nukleinsavak az élő sejtek létfontosságú makromolekulái, a **genetikai információ tárolásában** és **fehérjeszinten való megjelenítésében** játszanak fontos szerepet.

O. T. Avery, C. M. MacLeod és M. McCarty munkájának köszönhetően 1944 óta ismert, hogy a **genetikai információ hordozója a DNS**.

A. Gierer és G. Schramm dohánymozaik betegségét okozó vírussal végzett kísérleteivel 1956-ban azonban bebizonyította, hogy **RNS is lehet örökítő anyag**. Mai tudásunk alapján leszögezhető, hogy prokarióta és eukarióta sejtekben, valamint számos vírusban a DNS, egyes vírusok (pl.: influenzavírusok, Ebola-vírus, encephalitis-vírusok, hepatitis-vírusok, RNS-tumorvírusok, AIDS-vírusok) esetén pedig az RNS tárolja a fehérjék elsődleges szerkezetére vonatkozó információt.

A biológiai információ áramlási folyamatát az örökítő anyag és a fehérjék között a molekuláris biológia **centrális dogmaként** ismert alaptörvénye írja le (5. ábra, fekete részek).



5. ábra: A genetikai információ áramlása

Hosszú időn keresztül úgy vélték, hogy a genetikai információ áramlása egyirányú, de 1970-ben H. Temin és D. Baltimore felismerte, hogy az RNS tumor vírusok genetikai információja komplementer DNS-be (cDNS) íródik át egy reverz transzkriptáz nevű enzim segítségével.

Az 5. ábrán ezen kívül még az alábbi információk láthatók:

- A genom képes önmagát megduplázni (**DNS-replikáció**). Ha a genom RNS, akkor RNS keletkezik (**RNS-replikáció**). Az örökítő anyag megkettőződése a sejtben tárolt genetikai információ utódsejtekbe történő átvitelének előfeltétele. A replikációnak a

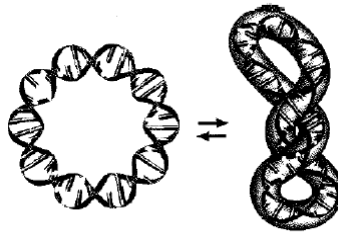
teljes genomra ki kell terjednie, ellenkező esetben a sejtosztódás az utódsejtekben génvesztést okozna; hatékonyak kell lenniük, hogy nagyméretű genomok is viszonylag rövid idő alatt megkettőződjenek; megbízhatónak kell lenniük, hogy az utódsejtekben az elviselhető mértéken felül ne jöjjenek létre mutációk.

- Az örökítő anyaggal szemben támasztott fontos követelmény az állandóság. Ennek teljesülése érdekében a DNS-ben keletkező hibák túlnyomó része kijavítódik a különböző **DNS-reparációs** mechanizmusok során. A sejteknek külön enzimrendszere van a hibajavításra („repair” enzimek). Mutációt sokféle hatás okozhat. A replikáció hibája esetén a szintetizálódó DNS-láncba nem komplementer bázisok épülnek be. A DNS károsodását spontán kémiai folyamatok is okozhatják. A bázisok dezaminációval aminocsoportot veszíthetnek, így például a citozin átalakulhat uracillá. Hőhatásra depurináció történhet, melynek során a purin bázisok leszakadnak a 2'-deoxiribózárról és ún. AP (apurin)-helyek keletkeznek a DNS-ben. A kémiai mutagének közül egyesek bázismetilációt okoznak (alkiláló ágensek), mások kovalens kötéssel a DNS-hez kapcsolódnak, vagy keresztkötést hoznak létre a komplementer láncok között. Az ultrabolya sugárzásnak erősen mutagén, hatására a DNS-láncok szomszédos pirimidin bázisai között kovalens kötéssel dimerek alakulnak ki, melyek a replikációt és a transzkripciót is gátolják. Az ionizáló sugárzások lánctöréseket és ezáltal kromoszóma-rendellenességeket idézhetnek elő.
- A DNS genom információirtartalma RNS-be íródik át a **transzkripciónak** nevezett folyamat során. Az RNS genom géntartalma RNS-be (**RNS-transzkripció**) vagy DNS-be (**reverz transzkripció**) íródhat át. Az RNS-genomról közvetlenül is végbemehet a transzláció.
- A **transzláció** egyirányú. (nincs arra utaló ismeretünk, hogy fehérjétől RNS-felé is irányulhat információátadás.)

Alakját tekintve a DNS-molekula cirkuláris (prokarióta DNS, egyes vírusok genomja, mitokondriális DNS, kloroplaszt DNS-e) vagy lineáris (egyes vírusok DNS-e, eukarióta nukleáris DNS). A prokarióták örökítő anyaga közvetlenül a citoplazmában helyezkedik el, míg az eukarióta genom membránnal elhatárolt sejtsejtszervecskében, a sejtmagban található. Az eukarióta sejtekben előforduló cirkuláris konformációjú, kovalensen zárt mitokondriális és kloroplaszt DNS-ek ún. extrakromoszomális DNS-ek, a kromoszomális DNS-től függetlenül osztódnak. A prokarióták is tartalmaznak a kromoszomális DNS-től függetlenül osztódó extrakromoszomális DNS molekulákat, ún. plazmidokat. Ezek általában olyan tulajdonságokat kódoló géneket tartalmaznak, amelyek a környezethez való jobb

alkalmazkodást segítik (pl.: toxin termelés, nehézfém rezisztencia, antibiotikum rezisztencia), de nem esszenciálisak a gazdaszervezet életben maradásához. Egy baktériumsejtben a plazmidok több, akár száz kópiában is előfordulhatnak, illetve többféle plazmid is lehet ugyanabban a sejtben. Méretük a néhány kilobázistól (10^3 bp) a megabázis (10^6 bp) nagyságrendig terjedhet.

Kinyújtott állapotban a DNS nem férne el a számára biztosított helyen, ezért erősen felcsavarodott, szuperhelikális formában van jelen a sejtekben (6. ábra). A DNS-nek nagyon tömörnek kell lennie tehát, hogy elférjen a prokarióta citoplazmában illetve az eukarióta sejtmagban, mindemellett ebben a szorosan csomagolt állapotban is végre kell hajtani azokat a biokémiai folyamatokat (pl. replikáció, transzkripció), amelyek a sejt életben maradásához és szaporodásához szükségesek.



6. ábra: A bakteriális DNS relaxált és szuperhelikális (felcsavarodott) állapotban

DNS-alapú vizsgálati módszerek

A DNS jóval stabilabb molekula, jobban ellenáll a megváltozott körülményeknek, mint a fehérjék, ezért a DNS-alapú vizsgálatok számos területen előtérbe kerültek napjainkban. Ehhez az is hozzájárult, hogy olyan eljárásokat dolgoztak ki az elmúlt évtizedekben, amelyek forradalmasították a nukleinsavak vizsgálatának lehetőségeit (pl.: restrikciós endonukleázok alkalmazása, hibridizációs és elektroforetikus módszerek tökéletesítése, nukleotid sorrend meghatározása (szekvenálás), nukleinsavak *in vitro* szintézise, polimeráz láncreakció (PCR)). A módszerek közös jellemzője, hogy kis mennyiségben jelenlevő nukleinsav szekvenciák vizsgálhatók velük, illetve kis különbségek is gyorsan és specifikusan kimutathatók.

Felhasználásuk kiterjed többek között:

- patogén mikroorganizmusok azonosítására (egészségügyben, élelmiszeriparban)
- öröklődő betegségek diagnosztizálására
- genetikailag módosított élelmiszerkomponensek detektálására
- kriminalisztikai vizsgálatokra

A DNS-alapú biokémiai, molekuláris biológiai vizsgálatok első lépése csaknem minden esetben a DNS kinyerése a mintából. A DNS stabil vegyület, izolálása során azonban mégis körültekintőnek kell lenni, mert a láncszerűen felépülő molekula véletlenszerű töréseket szenvedhet, melynek következtében hosszabb-rövidebb fragmentekre darabolódik fel. A folyamat katalizátorai lehet a víz és a benne oldott nukleáz enzimek, melyek aktivitása a DNS feldarabolására és alkotóelemeire való bontására terjed ki. A víz és a nukleáz enzimek a természetben bárhol fellelhetők, megtalálhatók az élő szervezetek minden egyes sejtjében. Részt vesznek a sejtek reprodukciójában, és az elhalt szövetek, sejtek DNS állományának megsemmisítésében. A sejt pusztulása után aktivitásuk nem szűnik meg, így gazdasejtjük anyagának lebontásában is szerepet játszanak. A DNS stabilitásának megőrzése érdekében az izolálási procedúra során olyan körülményeket (pH, hőmérséklet, stb.) kell biztosítani, amelyek jelentős mértékben lecsökkentik a nukleázok aktivitását.

A biokémiai degradációs folyamatokon túl egyéb fizikai és kémiai tényezők (pl.: mechanikai behatások, vegyszerek) is hatással lehetnek az izolálás során a kinyerni kívánt DNS stabilitására. Emiatt a DNS integritásának lehető legnagyobb mértékű megőrzése érdekében a DNS izolálási eljárásnak gyengédnek kell lennie. Másrészt azonban elég erélyesnek is kell lennie, hogy hatékonyan elválassza a DNS-t a sejt többi komponensétől.

A DNS tartalom kivonására többféle módszer létezik attól függően, hogy milyen típusú DNS-t szeretnénk kinyerni (egyszálú DNS, kétszálú DNS, sejtmagi DNS, organelláris DNS), mi a kinyerés célja (PCR, blotting technikák, klónozás, génmanipulációs technikák, stb.) és milyen mintából (vírus, prokarióta, növény, emlős, stb.) kívánjuk kivonni azt.

Általánosságban elmondható, hogy a különböző izolálási eljárások első lépései a DNS sejtekből való kiszabadítására irányulnak, a sejt falának, membránjának és magjának elroncsolása révén (pl.: ozmotikus sokkal, enzimes emésztéssel, detergens alkalmazásával, mechanikus behatással). Ezt követően történik meg több lépésben a DNS elválasztása a szennyező komponensektől, a fehérjéktől, RNS-ektől, lipidektől és poliszacharidoktól (pl.: fehérje és RNS degradáló enzimekkel, oldószeres extrakcióval, kromatográfiás eljárással).

A DNS izolálást követően **a DNS oldat koncentrációja spektrofotometriás módszerrel határozható meg.** Ennek alapja az aromás szerkezetű nukleinsav bázisok delokalizált elektronszerkezete miatti, ultraibolya tartományú fényelnyelés/gerjeszthetőség. 260 nm hullámhosszúságon fényabszorpciós (extinkcios) maximumuk van. Ezen az elven működő készülék az ún. NanoDrop, mely 1-2 μ l mintából is képes meghatározni az oldat DNS

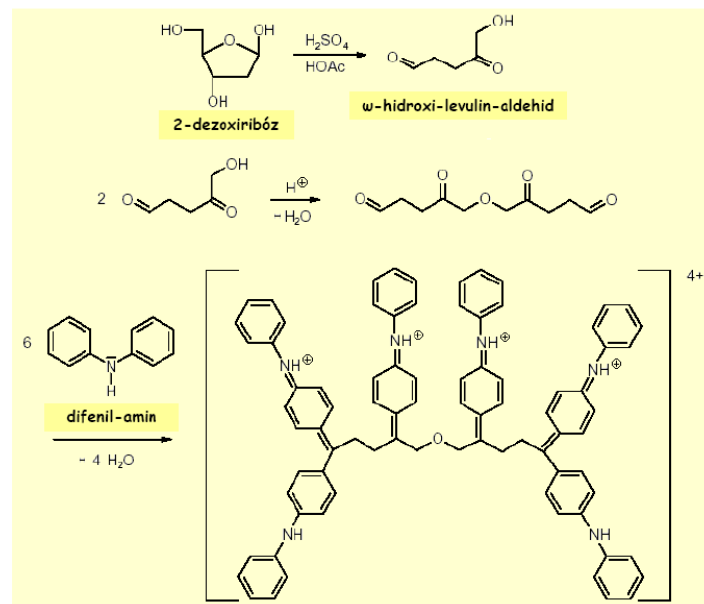
koncentrációját és szennyezettségét (lásd később), mely tulajdonsága nélkülözhetetlen, ha kevés az izolált DNS.

A DNS mennyiségének meghatározása látható fényben is megvalósulhat az alkalmazott színreakció abszorpciós maximumának megfelelően.

Példa erre az ún. Dische-reakció, melynek során a DNS molekula cukor része, a 2-dezoxiribóz savas körülmények között kék színű komplexet képez a difenilaminnal.

A kék vegyületnek 595 nm-nél van abszorpciós maximuma. Savas körülmények között a 2'-dezoxiribóz átalakul reakcióképes O-hidroxi-levulin-aldehiddé, ennek dimerje reagál végső soron a difenil-aminnal (7. ábra).

A fotometriás mérések kvantitatív adatokkal szolgálnak, melyek alapja a Lambert-Beer törvény.



7. ábra: Dische-reakció

A DNS oldat fehérjével való szennyezettségének meghatározása az A234/A260 hányados kiszámításával történhet. A nukleinsavak abszorbanciája ugyanis 234 nm-en minimális, míg az aminosavak jól elnyelnek ezen a hullámhosszon. Ideális minta esetén a hányados kisebb, mint 0,5. A fehérje szennyezettség mértéke az A260/A280 hányados meghatározása révén is megadható, mivel az aromás aminosavaknak 280 nm-en elnyelési maximumuk van. Tiszta DNS oldat esetén a hányados értéke 1,8-2,0 közé esik. 1,8-nál alacsonyabb érték fehérje (vagy az izolálási módszertől függően fenol) szennyezettségre utal, 2,0-nél magasabb érték pedig RNS-sel való kontaminációt feltételez. A fehérjék aromás aminosav tartalma azonban változó, ezért ez a módszer az előzőnél kevésbé alkalmas a DNS oldat tisztaságának ellenőrzésére.

Az izolált DNS fragmentumok méret szerinti (kvalitatív) meghatározása és elválasztása agaróz gélelektroforézissel történhet.

Az agaróz a D-galaktóz és a 3,6-anhidro-L-galaktóz lineáris polimere, tengeri moszatokból izolálják. Az agarózból készített gél **térhálós szerkezetű**, ez teszi alkalmassá a különböző hosszúságú (molekulatömegű) DNS molekulák elválasztására. A DNS molekulák elektromos erőterben képesek a gél térhálójában vándorolni. A DNS **pH=7,0 körül negatív töltésű**, így az **elektromos erőterben a pozitív pólus (anód) felé** mozdul el. A DNS mozgási sebességét több tényező is befolyásolja:

- A DNS fragmentum mérete
- Az agaróz gél koncentrációja
- A DNS konformációja (cirkuláris, szuperhelikális, lineáris)
- Az elektroforézis puffer összetétele
- Az alkalmazott feszültség
- Az alkalmazott interkalálódó festék

A mintánkban található ismeretlen hosszúságú DNS molekulák nagyságát úgy határozhatjuk meg, hogy ugyanazon a gélen ismert hosszúságú fragmenteket tartalmazó kontrollt (ladder/marker) is futtatunk. Ehhez viszonyítjuk majd a mintánkat.

Lemérjük a kontroll ismert méretű fragmentjei által a futtatás alatt megtett távolságot (a mintafelvitel helyét kezdő vonalnak véve), majd kalibrációs görbét készítünk. **A lineáris kettőszálú DNS molekula vándorlási sebessége (azaz az adott idő alatt megtett út) fordítottan arányos a molekulatömegek tízes alapú logaritmusával. (13. ábra)**

A DNS tömegét legtöbb esetben a molekulát alkotó bázispárok (bp) mennyiségével, azaz a DNS hosszával adják meg. Ez párszáz bázispártól több tíz kilobázisig (kb) is terjedhet.

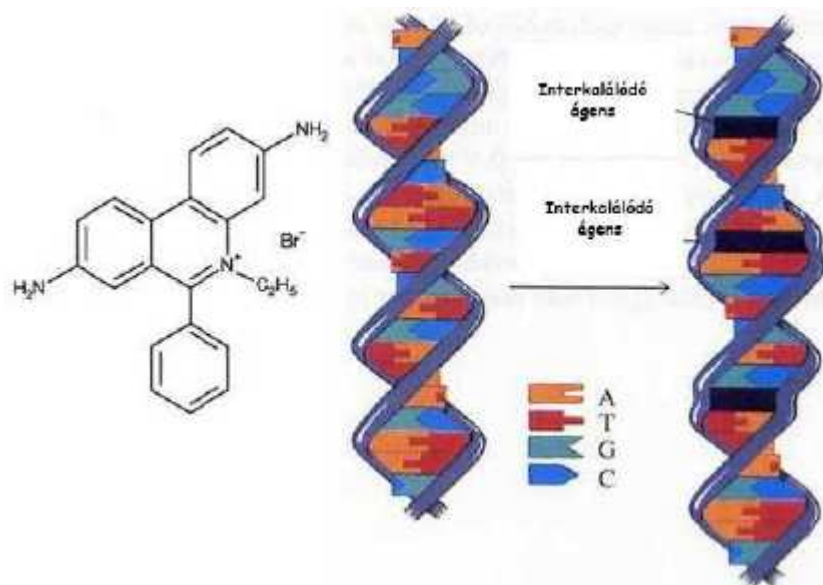
A DNS fragmenteket a DNS két lánc közé ékelődő ún. interkalálódó festék segítségével lehet láthatóvá tenni UV fényel megvilágított gélben. Ilyen festék például az etídium-bromid (8. ábra), mely UV fény hatására gerjesztődik, és az így szerzett energiát látható fény formájában adja le (590 nm, narancspiros) (9. ábra). Az etídium-bromid erősen **mutagén**, ezért kellő elővigyázatossággal kell használni. Manapság már léteznek egészségre kevésbé ártalmas festékek is, de ezek ára jelentősen meghaladja az etídium-bromidét.

Ezen festékeket két módon juttathatjuk a gélbe:

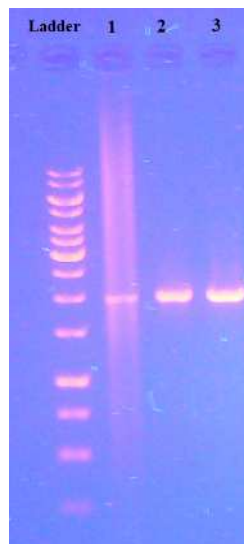
- a gél megöntése előtt adjuk hozzá
- a futtatás után a festék oldatába áztatjuk a gél

Szükség esetén a DNS visszanyerhető (kivágható) a gélből, és tisztítás után felhasználható további molekuláris biológiai célokra.

+ A módszer alkalmas hozzávetőleges mennyiségi meghatározásra is, de ez csak, egymáshoz viszonyított (relatív) adatokkal szolgál, és csak közel azonos méretű molekulák esetén. Az erősebben látható fragmentek nagyobb mennyiségben vannak jelen, mint halványabb társaik, a több interkalálódó festék miatt.



8. ábra: Az etídium-bromid szerkezete és beépülése a DNS molekulába



9. ábra: Gél UV fényben

Elsősorban fehérjék, de ritkán DNS esetén is, a minőségi meghatározás poliakrilamid gélelektroforézissel történhet. A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) során N,N'-metilénbiszakrilamiddal keresztkötött akrilamid polimerek által létrehozott gélben futtatjuk a

DNS mintát. A polimerizáció szabadgyökök jelenlétében zajlik le, általában ammónium-perszulfátot használunk szabadgyök donorként, és TEMED (N,N,N',N'-tetrametilénetiléndiamin) katalizálja a gyökképződést. A gél pórusméretét a polimerek hossza és a keresztkötések száma határozza meg. Ezek a tulajdonságok az akrilamid koncentrációjával, és az akrilamid:biszakrilamid arányának megválasztásával befolyásolhatjuk. A PAGE végrehajtása jóval körülményesebb és időigényesebb, mint az agaróz gélelektroforézisé, de több előnye is van:

- Felbontása sokkal nagyobb, akár 0,2% különbség is kimutatható a DNS fragmentumok méretében
- Nagyobb mennyiségű mintával lehet dolgozni
- A poliakrilamid gélből izolált DNS tiszta, így az a tisztaságra kényes módszereknél is felhasználható (egyszerűbb tisztítás)

Gyakorlati rész

❖ DNS izolálása növényi mintából

Az idő rövideje miatt a gyakorlaton csak néhány lépésből álló DNS izolálásra van lehetőség. Az így kinyert DNS csak további tisztítási lépések után válna alkalmassá molekuláris biológiai vizsgálatokra.

A DNS izolálás lépései:

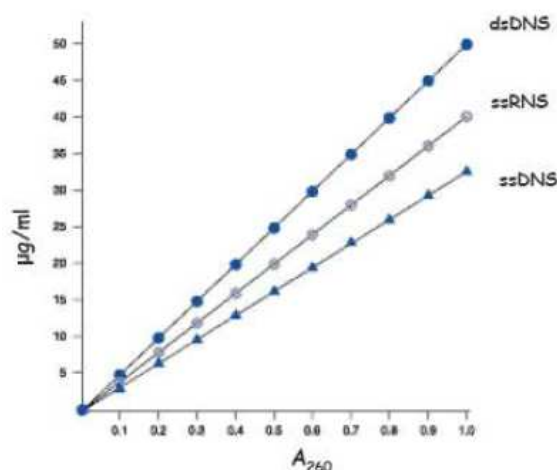
1. $5 \pm 0,5$ g banánt (a pontos mennyiséget a munkanaplóba jegyezzük fel) apróra darabolunk, majd dörzsmozsárba helyezzük.
2. Hozzáadunk 2,5 ml DNS izoláló puffert, és 5-7 percig dörzsöljük.
3. Ismét hozzáadunk 2,5 ml DNS izoláló puffert, és homogenitásig dörzsöljük.
4. A homogenizátumot 15 ml-es Falcon-csőbe töltjük.
5. Hozzáadunk 0,5 ml 10%-os SDS és 0,5 ml 5M-os NaCl oldatot, majd a cső fel-le forgatásával összekeverjük a mintát. **FIGYELEM:** A gyakorlat során pipetázáskor mindig ügyelj arra, hogy a megfelelő méretű pipettát használd!
6. ~ 60 °C-os vízfürdőn 20 percig inkubáljuk a mintát, közben 5 percenként gyengéden a cső fel-le forgatásával keverjük.
7. A Falcon- csöveket kiegyensúlyozzuk, majd 10 percig 6-8000 rpm fordulatszámon centrifugáljuk 4°C-on. **FIGYELEM:** A centrifugálások alkalmával mindig ügyelj arra, hogy a rotorba kiegyensúlyozottan helyezd be a csöveket!
8. A felülúszót tiszta Falcon-csőbe töltjük át, és meghatározzuk a térfogatát.
9. Azonos térfogatú -20°C-os cc. izopropanolt rétegezünk a felülúszóra, majd jól összeforgatjuk. **FIGYELEM:** Az izopropil-alkohol irritatív és tűzveszélyes!
10. A mintát pár percig állni hagyjuk, majd a kicsapódott DNS-t centrifugálással leüleptítjük (7-9000 rpm, 7-10 perc).
11. A felülúszót leöntjük, a DNS-t ~10 percig szárítószekrényben szárítjuk (illetve addig, amíg az alkohol illata már nem érezhető). A szárítás meggyorsítható, ha a Falcon cső oldalán visszafolyó izopropanolt pipettával időről-időre leszívjuk.
12. Feloldjuk a DNS-t 5 ml TE pufferben, és jégen tároljuk.

Az izolálás során használt oldatok összetevői:

- DNS izoláló puffer:
50 mM Trisz-(hidroxi-metil-amino-metán)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
pH=8,0
- TE-puffer:
10 mM Trisz-(hidroxi-metil-amino-metán)
1 mM EDTA
pH=8,0
- 10%-os SDS oldat
- 5M NaCl oldat
- cc. iPrOH (-20 °C-os)

❖ Az izolált DNS mennyiségének és tisztaságának meghatározása

1. Az izolátumból tízszeres hígítást készítünk TE pufferrel.
2. Mérjük a DNS oldat abszorbanciáját 260 nm-en
3. Mérjük a DNS oldat abszorbanciáját 234 nm-en.
4. Számítsuk ki 1g banán közelítő DNS tartalmát a 260 nm-en mért abszorbancia alapján! A számítás során figyelembe kell vennünk, hogy 50 µg/ml koncentrációjú kettőszálú DNS oldat esetén $OD_{260}=1,0$ (10. ábra). A számítás közben eltekintünk a fehérjeszennyezésből adódó hibától, de ne feledkezzünk meg a hígításról!
5. Számítsuk ki a A_{234}/A_{260} hányadost, és mondjunk véleményt a DNS fehérjeszennyezettségről!



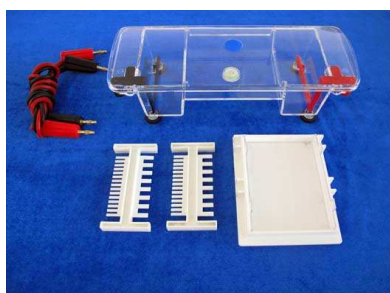
Kettős szálú DNA (dsDNS):
 $A_{260} = OD_{260} = 1 \rightarrow c = 50 \mu\text{g/ml}$
Egyszálú RNS (ssRNS):
 $A_{260} = OD_{260} = 1 \rightarrow c = 40 \mu\text{g/ml}$
Egyszálú DNA (ssDNS):
 $A_{260} = OD_{260} = 1 \rightarrow c = 33 \mu\text{g/ml}$

10. ábra: Az ssDNS, ssRNS és dsDNS-t tartalmazó oldat koncentrációja 260 nm-en

❖ DNS minta minőségi meghatározása (agaróz gélelektroforézis)

Az agaróz gélelektroforézis kivitelezésének lépései:

1. Kimérjük az adott mennyiségű agaróz port, és TAE (Tris-ecetsav-EDTA) pufferben oldjuk (általában 1 m/v%-os oldatot készítünk, egy gélhez a gélalca nagyságától függően 30-100 ml oldat szükséges). Az agaróz csak melegítés hatására oldódik, ezért mikrohullámú sütőben melegítjük az oldatot. Teljes feloldódásig kell melegíteni az oldatot, mivel a fel nem oldódott kis szemcsék zavarják a mérést. Ügyeljünk arra, hogy elkerüljük az oldat felforrását, hiszen az így elpárolgó oldószer az oldat betöményedéséhez vezet.
2. Kb. 55°C-ra hűtjük folyóvíz alatt, majd hozzáadjuk az interkalálódó festéket (100 mikrogram/ml-s törzsoldatból ezred mennyiség). Ügyeljünk arra, hogy ne érintkezzünk a festékkel, mivel mutagén hatású.
3. Megöntjük a gélalca mintaszámnak megfelelő fésű használatával, melynek feladata a mintafelviteli zseb kialakítása a gélben. Ügyeljünk arra, hogy a gél ne tartalmazzon buborékokat!
4. Hozzávetőleg 20 percig állni hagyjuk, míg a gél megdermed.
5. A szilárd gélalca futtatókádba helyezük, és a kádat feltöltjük TAE pufferrel.
6. Eltávolítjuk a fésűt, majd felvisszük a markert és az előkészített mintákat.
7. A készülékfedő elhelyezése után elindítjuk a futtatást adott egyenfeszültségen, melyet a futtatókádkhoz csatlakoztatott tápegységen állíthatunk be (ez 40-120 V közötti érték, nagyobb gél esetén nagyobb feszültséget alkalmazhatunk, valamint az elválasztási idő is csökkenthető magasabb feszültség alkalmazásával, de ez egy ponton túl az elválasztás minőségének rovására megy).
8. A futási frontot figyelve megállapítjuk a futtatás végét. Ha a front elérte a gél alját, lekapcsoljuk a készüléket.
9. A gélalca UV-fénnyel alulról megvilágítva vizsgáljuk, lefotózzuk vagy kivágjuk belőle a kívánt fragmentet.



11. **ábra:** Futtatókád, gél forma és különböző méretű fésűk

A minta előkészítése:

A mintát festékekkel keverjük össze a futási front láthatóvá tételének érdekében, mivel a minták szabad szemmel nem láthatók. Ennek alkalmazásával elkerülhető, hogy a mintákat kifuttassuk a gélből. A festék típusától/töménységétől függően állapítjuk meg az összemérés arányait. A gél zsebeinek méretétől, céljainktól és a mintánk koncentrációjától függően 5-50 μ l mintát szokás felvinni a géltre. A felvitt minta 15-20%-a a frontot jelző festék.

Az előkészítést parafilmen cseppek formájában vagy PCR csőben is végezhetjük.

Fontos megjegyezni, hogy a futási frontot jelző és az interkalálódó festék nem ugyanaz! Mind összetételben, mind funkcióban különböznek.

A futási frontot jelző festék összetevői:

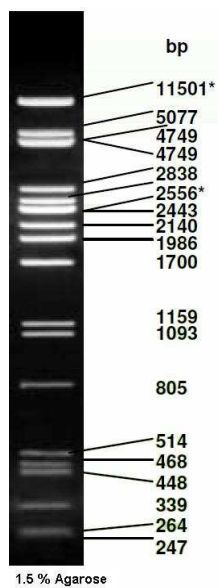
Az egyik leggyakrabban használt festék az ún. *LoadingDye*, mely az alábbi összetevőket tartalmazza:

- Glicerín: nagy sűrűséget ad, ezért a mintákat könnyen a zsebek aljára pipettázhatjuk, miközben a gél a futatópufferbe van merítve
- Egy vagy kétféle festék (futás nyomon követése)
 - brómfenolkék: mobilitási tulajdonságai nagyon jók, a kisméretű (100 bp alatti) DNS molekulákkal egy vonalban fut, ezért ez a sötétkék szín a futási frontot jelzi (legalább ennek a festéknek benne kell lennie a mintákban)
 - xilén-cianol: aránylag lassan halad a gélben, a 3-4 kbp körüli DNS molekulákkal egyvonalban, így alkalmazásával látható, hogy adott pillanatban ez a mérettartomány hol halad a gélben.

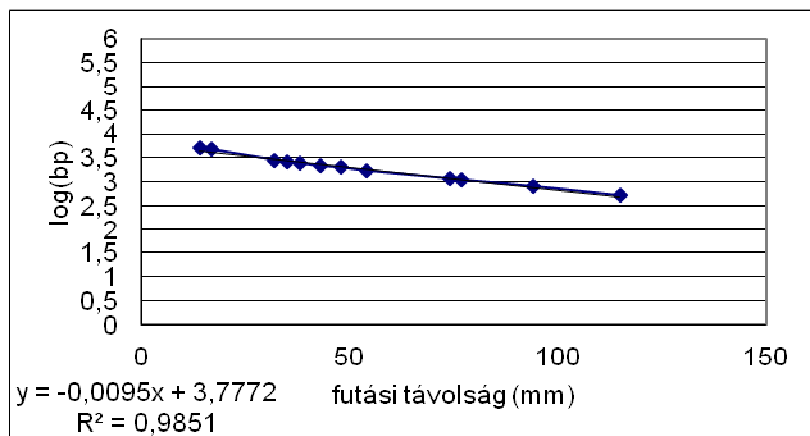
Egyes keverékekben akár 3-4 féle festék is található a pontosabb nyomon követhetőség végett.

Kalibráció:

Minden esetben ismert méretű fragmenteket tartalmazó laddert futtatunk az ismeretlen minták mellett, mivel a futtatást sok tényező befolyásolja. A gyártó megadja a ladder által tartalmazott fragmentek méretét (12. ábra). Ezek **zsebhez viszonyított távolságát** lemérjük, és **ábrázoljuk a méret (bp-k száma) logaritmusának függvényében**. Így kapjuk a **negatív meredekségű, lineáris** kalibrációs egyenest (13. ábra).



12. ábra: Kalibrációs marker/ladder



13. ábra: Kalibrációs egyenes

Az agaróz gélelektroforézis kellékeiről és a kivitelezés fontosabb lépéseiről további fotók találhatóak a mellékletben.

Ellenőrző kérdések

Felkészülés: laborjegyzet, Biokémia előadás kapcsolódó anyaga

1. Milyen különbség van a DNS és az RNS molekula között? Nevezd meg legalább három különbséget!
2. Milyen alkotókból épülnek fel a nukleotidok?
3. Hogyan épülnek fel szerkezetileg a polinukleotidok?
4. Mi a hiperkromicitás és a hipokromicitás jelensége?
5. Mit értünk a molekuláris biológiában centrális dogmán? Milyen kivételes eseteket ismersz?
6. Vázold fel a Chargaff-szabályokat!
7. Milyen feladatot végez a reverz transzkriptáz enzim?
8. Mit jelent az, hogy a DNS szintézis szemikonzervatív?
9. Mit értünk az alatt, hogy a genetikai kód univerzális? Mit és milyen formában kódol?
10. Tanulmányozd át a DNS izolálás során használt pufferek összetételét és az alkalmazott egyéb vegyszereket! Mi lehet a szerepük?
11. Hogyan mérhető az izolált DNS tisztasága? Ismertesd a tiszta izolátum kritériumait!
12. Vázold fel röviden az agaróz gélelektroforézis lényegét! (alkalmazás, működési elv)
13. Mitől függ a DNS vándorlási sebessége az agaróz gélben?
14. Mit értünk definíciószerűen a DNS olvadáspontján? A DNS mely tulajdonságai vannak befolyással az olvadáspont értékére?
15. Hogyan tehető láthatóvá a gélelektroforézis során a DNS fragmentek a gélben? Mi áll a jelenség hátterében?
16. Hogyan határozható meg egy DNS-fragment mérete agaróz gélelektroforézissel? (elv, arányosság, kalibráció)
17. Hogyan követhető nyomon a futtatás agaróz gélelektroforézis során?
18. Jellemezd a DNS méretének meghatározására szolgáló kalibrációs egyenest!
19. Milyen tulajdonságokkal kell bírnia a DNS- replikációnak?
20. Mi a különbség az agaróz- és a poliakrilamid gélelektroforézis közt? Sorolj fel legalább hármat!

Felhasznált és ajánlott irodalom

- Sarkadi L: Biokémia mérnökszemmel, Typotex Kiadó, 2007
- Kovács Zita: Nukleinsavak: DNS-izolálás, analízis (korábbi laborjegyzet)
- Ajtai K, Orsi F, Varga J, Bekes F, Smied I, Gaugecz J, Hidvégi M: Biokémia gyakorlat, Műegyetemi Kiadó, 1998
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walker P: Molecular biology of the cell, Garland Science, Fourth edition, 2002

Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mboc4.TOC&depth=2>

- Bolsover SR, Hyams JS, Shephard EA, White HA, Wiedemann CG: Cell biology: A short course, John Wiley & Sons, Inc., Second edition, 2004
- Hidvégi E (szerk.): A genom, Széphalom Könyvműhely, 2003
- Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Baltimore D, Darnell J: Molecular cell biology, W. H. Freeman & Co., Fourth edition, 2000

Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.TOC>

- Szeberényi J: Molekuláris sejtbiológia, Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 1999
- Wilson K, Walker J: Principles and techniques of biochemistry and molecular biology, Cambridge University Press, Sixth Edition, 2005

Melléklet: Watson és Crick eredeti cikke 1953-ból

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

J. D. Watson
F. H. C. Crick

April 25, 1953, *Nature*, Vol. 171, page 737

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.



This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining beta-D-deoxyribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's² model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's "standard configuration," the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each every 3.4 Å. in the *z*-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The

planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z -coordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{3,4} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{5,6} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of coordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

¹ Pauling, L., and Corey, R. B., *Nature*, 171, 346 (1953); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, 39, 84 (1953).

² Furberg, S., *Acta Chem. Scand.*, 6, 634 (1952).

³ Chargaff, E., for references see Zamenhof, S., Brawerman, G., and Chargaff, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, 9, 402 (1952).

⁴ Wyatt, G. R., *J. Gen. Physiol.*, 36, 201 (1952).

⁵ Astbury, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1, Nucleic Acid, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).

⁶ Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, 10, 192 (1953).

Melléklet: Agaróz gélelektroforézis fotók (a felvételeket készítette: Kádár Veronika)

