



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Oznaczanie zasad purynowych i pirymidynowych z zastosowaniem spektrofotometrii UV/VIS oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego

Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu
Biotechnologia

Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna

Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

CEL ĆWICZENIA

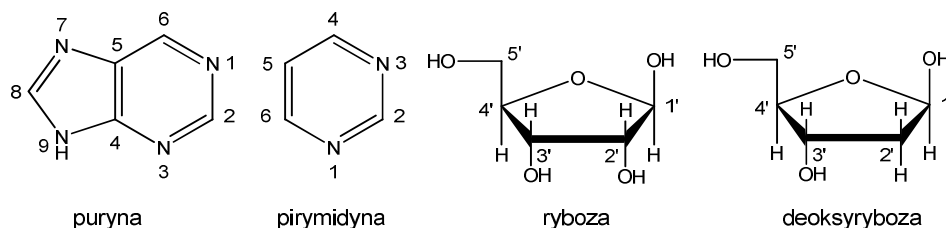
Celem I i II części ćwiczenia jest przeprowadzenie chemicznej hydrolizy RNA i DNA. W III części oznacza się ilościowo zawartość zasad purynowych i pirymidynowych w otrzymanym preparacie z wykorzystaniem spektrofotometrii UV/VIS. Celem IV części ćwiczenia jest określenie struktury nieznannej zasady na podstawie widm magnetycznego rezonansu jądrowego.

PODSTAWY TEORETYCZNE

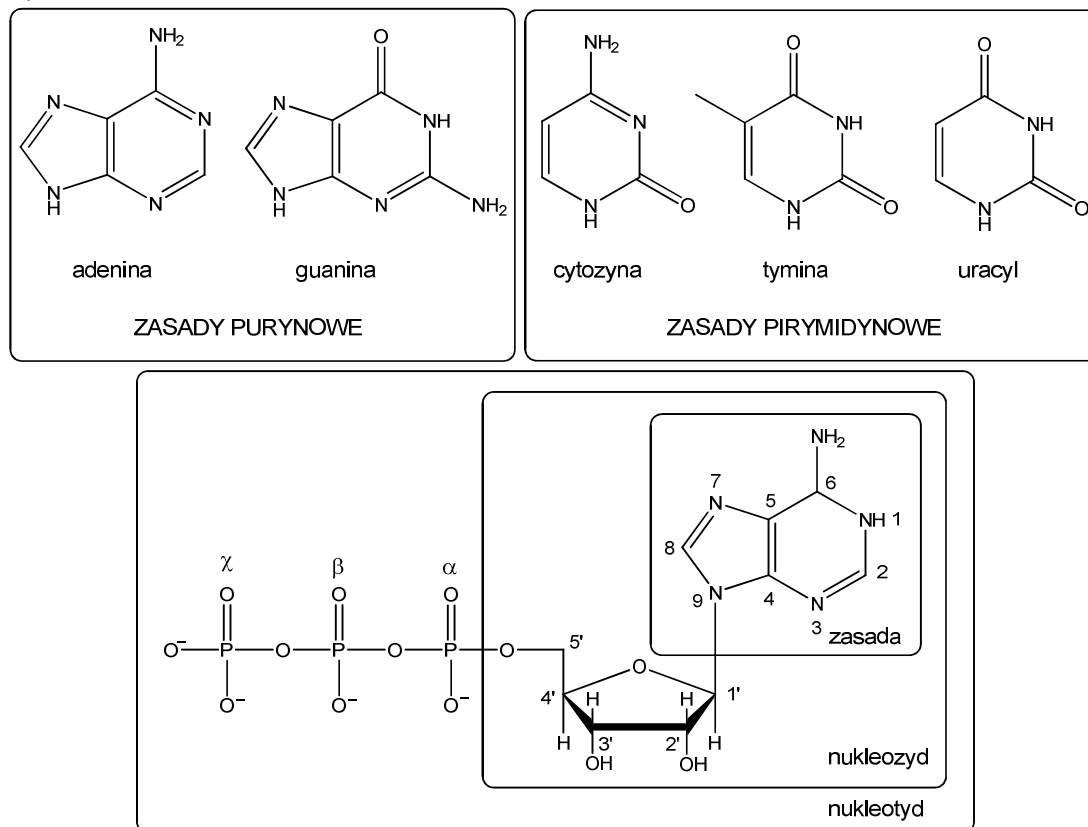
Puryny i pirymidyny (Rys. 1a) są prekursorami DNA i RNA oraz wielu koenzymów, są związkami niezbędnymi w regulacji cyklu komórkowego, gromadzeniu i transporcie energii oraz są przenośnikami składników błon komórkowych i cukrów.

W organizmie żywym występują w kilku formach: jako wolne zasady, nukleozydy lub nukleotydy (Rys. 1b). Wolne zasady i nukleozydy występują głównie w płynach ustrojowych, zaś nukleotydy występują wyłącznie w przestrzeni wewnątrzkomórkowej.

a)



b)



Rysunek 1

Rybonukleotyd zbudowany jest z pierścienia rybozy, w którym atomy węgla numeruje się od 1' do 5'. W przypadku deoksyrybonukleotydu, grupa hydroksylowa przy atomie węgla C2' jest zastąpiona atomem wodoru. Częsteczka cukru jest kowalencyjnie związana w pozycji C1' z N9 zasady purynowej lub N1 zasady pirymidynowej. Utworzone w ten sposób wiązanie N-glikozydowe ma konfigurację β . Najczęstszym miejscem estryfikacji w nukleotydach jest grupa hydroksylowa przy węglu C5' cukru. Tego rodzaju połączenie nazywane jest nukleozydo-5'-fosforanem (w zależności od ilości reszt kwasu fosforowego – mono-, di- lub tri fosforanem) lub 5'-nukleotydem. Dla podkreślenia kwaśnego charakteru tych związków są one niekiedy nazywane kwasami, np. kwas adenylowy, guanylowy, cytydylowy, urydylowy itp.

W przemianach zachodzących w organizmie najczęściej biorą udział di- i trifosforany nukleozydów: CDP i CTP, UDP i UTP, ADP i ATP, GDP i GTP oraz IDP i ITP. Najbardziej rozpowszechnione są nukleotydy adeninowe, które są dawcami energii dla wszystkich syntez komórkowych oraz biorą udział w aktywacji kwasów tłuszczowych i aminokwasów. Nukleotydy urydynowe aktywują cukry i biorą udział w syntezie laktozy i glikogenu. Nukleotydy cytydynowe biorą udział w syntezie lipidów, a guaninowe w biosyntezie białek.

W DNA i RNA kolejne nukleotydy połączone są ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi pomiędzy resztami kwasu fosforowego i cukru tworząc długie polimerowe łańcuchy. Ponieważ fosforan połączony z grupą hydroksylową przy C5' jednego nukleotydu wiąże się z grupą hydroksylową przy C3' nukleotydu następnego, a wiązanie to jest wiązaniem estrowym, nazywa się je wiązaniem 3',5'-fosfodiesterowym.

Najważniejszymi grupami funkcyjnymi puryn i pirymidyn są niewątpliwie pierścieniowe atomy azotu, grupy karbonylowe oraz grupy aminowe przyłączone bezpośrednio do pierścienia heterocyklicznego. Wiązania wodorowe tworzone przez te grupy pozwalają na komplementarne związanie się dwóch pojedynczych nici kwasu nukleinowego w których to adenina łączy się specyficznie z tymidyną (lub uracylem w RNA), a guanina z cytozyną. Pomiedzy komplementarnymi zasadami tworzy się maksymalna (spośród możliwych) liczba wiązań wodorowych. W każdej parze G:C są trzy wiązania wodorowe, a w parze A:T(U) dwa wiązania wodorowe.

PRZEBIEG ĆWICZENIA

I. Zasadowa hydroliza RNA

Oznaczanie obecności kwasów nukleinowych w materiale biologicznym opiera się na ich charakterze wielkocząsteczkowym, zdolności absorbowania światła UV oraz na analizie składu kwasów nukleinowych. Większość charakterystycznych reakcji dla poszczególnych składników kwasów nukleinowych zachodzi dopiero po całkowitej hydrolizie makrocząsteczki na składniki proste. W tym celu przeprowadza się hydrolizę chemiczną kwasu nukleinowego. Zarówno DNA jak i RNA hydrolizują w środowisku kwaśnym pod działaniem mocnych kwasów (H_2SO_4 , HCl, $HCOOH$) w podwyższonej temperaturze, przy czym reakcja ta jest wolniejsza dla DNA. RNA hydrolizuje w podwyższonej temperaturze już pod wpływem rozcieńczonych kwasów. Uwalniane są wówczas zasady purynowe i nukleotydy pirymidynowe. Wiązania N-glikozydowe w nukleotydach pirymidynowych (cytydino-3'-P i urydino-3'-P) są trwalsze i ulegają hydrolizie dopiero w stężonych roztworach kwasów.

W środowisku alkalicznym kwas rybonukleinowy RNA ulega hydrolizie do nukleotydów purynowych lub pirymidynowych. Powstają odpowiednie kwasy: adenilowy, guanylowy, cytydylowy i urydylowy.

Odczynniki:

- 100-200mg RNA,
- 0.3M roztwór NaOH,
- 0.01M roztwór NH_4Cl ,
- 0.002M, 0.005 i 0.0075M roztwór HCl,
- woda destylowana.

Szkoło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- łaźnia wodna,
- kolumna z wypełnieniem anionitowym w formie chlorkowej (DOWEX-1),
- zlewki,
- kolby stożkowe,
- odbieralniki,
- kuwety kwarcowe,
- bagietki,
- pipety Pasteur'a.

Wykonanie ćwiczenia

1. Procedura zasadowej hydrolizy RNA

100-200mg RNA hydrolizuje się w obecności 0.03M r-ru NaOH w temp. 37°C w czasie 8-12 godzin. Po zubożeniu hydrolizatu za pomocą 0.01M NH_4Cl roztwór rozcieńcza się do końcowego stężenia 0.02M w stosunku do anionu chlorkowego.

2. Chromatograficzny rozdział składników hydrolizatu RNA

Na kolumnę z wypełnieniem anionitowym w formie chlorkowej (DOWEX-1) nanosi się hydrolizat RNA. Zatrzymane na kolumnie nukleotydy, zasady purynowe i pirymidynowe, po przemyciu kolumny 60ml wody oraz 600ml 0.01M roztworu NH_4Cl , wymywa się 0.002M roztworem HCl (2-3dm³). Zbiera się frakcje o objętości 20ml dla których oznacza się absorbancję w przedziale długości fali $\lambda=230-310\text{nm}$. Gdy przy $\lambda=260\text{nm}$ absorbancja w eluacie będzie niższa od 0.01, kolumnę należy przemywać 0.005M roztworem HCl (2-3dm³), a następnie 0.0075M roztworem HCl. W odbieranych frakcjach mierzy się absorbancję przy następujących długościach fal (w nm): 250/260, 280/260, 290/260. Odpowiednie nukleotydy identyfikujemy na podstawie danych przedstawionych w Tabeli 1:

Tabela 1.

	Wartość absorbancji przy danej długości fali λ		
	250/260	280/260	290/260
Kwas adenilowy	0.84	0.22	0.03
Kwas cytydylowy	0.45-0.50	1.80-2.00	1.22-1.43
Kwas guanylowy	1.02	0.67	0.04
Kwas urydylowy	0.80	0.28-0.33	0.03

II. Kwaśna hydroliza DNA

Kwas dezoksyrybonukleinowy DNA jest odporny na działanie mocnych zasad (pozostawienie go w roztworze 1M NaOH przez 20–40 godz. w temp. 37°C nie prowadzi do powstania żadnych produktów hydrolizy zasadowej). W tych samych warunkach RNA rozpada się całkowicie do mieszaniny 2'- i 3'-monofosfonukleozydów. Możliwe jest to dzięki obecności grupy –OH przy atomie C2' rybozy, która w środowisku zasadowym uczestniczy w tworzeniu nietrwałych cyklicznych nukleozydo-2',3'-fosforanów, rozpadających do nukleozydo-2'- i nukleozydo-3'-fosforanów. Brak grupy -OH przy atomie C2' deoksyrybozy uniemożliwia powstanie cyklicznych fosforanów nukleozydów w czasie hydrolizy zasadowej DNA co jest przyczyną oporności kwasów dezoksyrybonukleinowych na działanie zasad, dlatego DNA hydrolizuje się w środowisku kwasowym z otrzymaniem odpowiednich zasad purynowych lub pirymidynowych, deoksyrybozy i kwasu fosforowego. Powstające zasady: adeninę, guaninę, tyminę i uracyl rozdziela się chromatograficznie.

Odczynniki:

- 20mg DNA,
- 70% roztwór HClO_4 ,
- 2M roztwór HClO_4 ,
- 0.1M, 2M i stężony roztwór HCl,
- izopropanol,
- woda destylowana.

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- łaźnia wodna,
- wirówka laboratoryjna,
- wytrząsarka,
- zlewki,
- kolby stożkowe,
- odbieralniki,
- bagietki,
- pipety Pasteur'a.
- komora chromatograficzna,
- bibuła do chromatografii bibułowej,
- lampa UV,
- linijka, ołówek, nożyczki.

Wykonanie ćwiczenia

1. Procedura kwaśnej hydrolizy DNA

20mg DNA hydrolizuje się w obecności 0.5ml 70% roztworu HClO_4 ogrzewając zawiesinę we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Po ochłodzeniu hydrolizat rozcieńcza się wodą do 2ml i wiruje. Klarowny supernatant poddaje się rozdzielowi metodą chromatografii bibułowej.

2. Chromatograficzny rozdział składników hydrolizatu DNA

Na pasek bibuły o wymiarach 15x50cm nanosi się na linie startową w odległości 7cm od końca bibuły 10 μl hydrolizatu DNA i 10 μl 2M roztworu HClO_4 oraz 10 μl wzorcowych zasad purynowych i pirymidynowych rozpuszczonych w 2M roztworze HCl. Bibułę suszy się na powietrzu i umieszcza w naczyniu z roztworem eluującym (izopropanol 65ml, stężony HCl 17.7ml, woda destylowana do 100ml). Chromatogram rozwija się 15 godzin w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu określa się położenie plam odpowiadających poszczególnym zasadom azotowym za pomocą lampy UV. Ołówkiem zaznacza się kontury plam, po czym wycina się prostokątne paski bibuły z poszczególnymi plamami. Otrzymane wycinki tną się na drobne skrawki, umieszcza się w probówkach wirówkowych i zadaje 5ml 0.1M roztworu HCl. Probówki wytrząsa się przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie wiruje. Mierzy się absorbancję w supernatantach wobec próby kontrolnej, którą przygotowuje się następująco: wycina się pasek bibuły o powierzchni równej powierzchni paska z zasadą azotową i eluuje jak opisano.

III. Oznaczanie zasad purynowych i pirymidynowych metodą spektroskopii UV/VIS

Selektywne pochłanianie promieniowania nadfioletowego (UV) z maksimum absorpcji przy $\lambda=260\text{ nm}$ przez nukleotydy, nukleozydy oraz zasady azotowe budujące DNA i RNA wynika z obecności układów purynowego i pirymidynowego zawierających w swej budowie sprzężone wiązania podwójne. Widma absorpcji zasad azotowych i odpowiadających im nukleotydów są bardzo podobne, ponieważ obecne reszty cukrowe oraz grupy fosforanowe nie mają wpływu na intensywność i charakter pochłaniania światła. Wielkość absorbancji DNA nie jest sumą absorbancji wszystkich zasad azotowych wchodzących w jego skład i jest niższa o około 40% od wartości teoretycznie obliczonej na podstawie składu. Zjawisko to nosi nazwę efektu hipochromowego, który związany jest z helikalnym uporządkowaniem przestrzennym obu nici polinukleotydowych, opisanych strukturą drugorzędową i trzeciorzędową DNA. Preparaty kwasów nukleinowych mogą być zanieczyszczone białkami, których maksimum pochłaniania światła przypada w paśmie 280 nm. Własności spektroskopowe makrocząsteczek pozwalają określić przybliżoną czystość preparatów kwasów nukleinowych na podstawie wartości stosunku absorbancji przy 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}).

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- kuwety kwarcowe,
- pipety Pasteur'a.

Wykonanie ćwiczenia

Otrzymane eluaty przenosi się do 1cm kuwet kwarcowych i oznacza ich absorbancję wobec próby kontrolnej w zakresie długości fali $\lambda=230-310\text{nm}$. Określenie zawartości zasad purynowych i pirymidynowych można dokonać na dwa sposoby:

1. Na podstawie wartości absorbancji w maksimum absorpcji przy znanym molowym współczynniku absorpcji zasad (Tabela 2)

Tabela 2.

Zasada	λ_{max} [nm]	Molowy współczynnik absorpcji ϵ (0.01M HCl)	Masa molowa
Adenina	262.5	12600	135.13
Guanina	249	11100	151.13
Uracyl	260	8150	112.09
Tymina	265	7950	126.11
Cytosyna	276	10000	111.10
Adenozyna	259	15400*	267.24

* przy pH=7

$$c_{\text{mol}} = \frac{A_{\text{max}}}{\epsilon_{\text{max}} \cdot l} \quad [\text{mol/dm}^3]$$

A_{max} - wartość absorbancji w λ_{max}

ϵ_{max} - molowy współczynnik absorpcji

l - grubość kuwety [cm]

2. Z różnic absorbancji przy dwóch długościach fali

$$\Delta A = A_{\text{max}} - A_{290(300)}$$

A_{max} - wartość absorbancji w λ_{max}

$A_{290(300)}$ - wartość absorbancji przy $\lambda=290\text{nm}$ (dla guaniny i cytozyny przy $\lambda=300\text{nm}$)

Dla roztworów standardowych zawierających $10\mu\text{g}$ zasady w 1ml 0.1M roztworu HCl różnice absorbancji są następujące:

dla adeniny $A_{(262.5-290)} = 0.900$

dla guaniny $A_{(242-300)} = 0.475$

dla uracylu $A_{(259-290)} = 0.590$

dla cytozyny $A_{(276-300)} = 0.863$

dla tyminy $A_{(265-290)} = 0.549$

Zawartość danego związku oblicza się porównując odczytaną wartość absorbancji z absorbancją roztworu wzorcowego o znanym stężeniu, oznaczoną w tych samych warunkach.

$$\frac{c_x}{\Delta A_x} = \frac{c_{wz}}{\Delta A_{wz}}$$

Po wykonaniu pomiarów absorbancji hydrolizatów DNA lub RNA obliczamy stężenia zasad purynowych i pirymidynowych obiema metodami.

IV. Oznaczanie zasad purynowych i pirymidynowych DNA i RNA z zastosowaniem spektroskopii NMR

Dla wybranej, nieznanej próbki zasady purynowej lub pirymidynowej wykonuje się zestaw widm 1D i 2D NMR: 1H-NMR, 13C-NMR, COSY, HETCOR, HMQC, HSQC, HMBC i analizuje się otrzymane widma w celu ustalenia struktury badanego związku.

PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ

1. Przeczytaj uważnie instrukcję i dokładnie przeanalizuj czynności oraz techniki laboratoryjne opisane w części eksperymentalnej.
2. Zapoznaj się z zagrożeniami związanymi z stosowanymi odczynnikami oraz poszczególnymi czynnościami wykonywanymi na zajęciach (karty charakterystyk).
2. Zwróć uwagę czy znasz następujące pojęcia: hydroliza, prawo Lamberta-Beera, absorbancja, molowy współczynnik absorpcji, COSY, HETCOR, HMQC, HSQC, HMBC.
3. Zastanów się, czy wiesz: na czym polega spektrofotometria UV/VIS, jakie zjawisko wykorzystuje się stosując tą metodę, jakie związki można oznaczać za jej pomocą oraz jak jest zbudowany i jak działa spektrofotometr UV-VIS.
4. Zastanów się, czy potrafisz: wymienić nazwy zasad purynowych i pirymidynowych, tworzonych przez nie nukleozydów i nukleotydów oraz narysować ich struktury, wymienić różnice w budowie DNA i RNA.

OPRACOWANIE WYNIKÓW

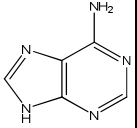
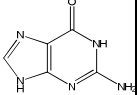
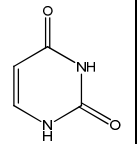
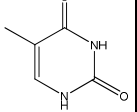
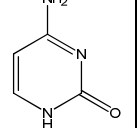
W celu opracowania sprawozdania należy:

- a) opisać dokładnie czynności wykonywane na zajęciach z uwzględnieniem ilości stosowanych odczynników,
- b) dokonać niezbędnych obliczeń (w tym przeliczeń stężeń jeśli było to konieczne),
- c) zebrać otrzymane wyniki i zebrać je w Tabeli 3 dołączonej do instrukcji,
- d) wyciągnąć właściwe wnioski.

LITERATURA

- J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2005).
- W.E. Cohn, E. Volkin, J.X Khym, *Biochemical Preparations*, **5**, 49 (1957).
- H.J. Vogel, A. Marshak, *J. Biol. Chem.*, **189**, 597 (1951).
- L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN, Warszawa (2003).
- R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, Vi. W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry* 26th ed, Lange Medical Books/McGraw-Hill (2003)

Tabela 3

Lp.	Zasada	Wzór chemiczny	$\lambda_{\max}$ lit. [nm]	Molowy współczynnik absorpcji ϵ (0.01M HCl)	Wartość lit. $\Delta A(\lambda_{\max} - \lambda_{290})^a$ lub $\Delta A(\lambda_{\max} - \lambda_{300})^b$ dla c=10µg/ml	$\lambda_{\max}$ [nm] dośw.	Absorbancja A [1cm] $\lambda_{\max}$	Absorbancja [290/300nm]	Stężenie [mol/dm ³]	Stężenie [µg/ml]	Wartość oznaczona $\Delta A(\lambda_{\max} - \lambda_{290})$ lub $\Delta A(\lambda_{\max} - \lambda_{300})$ dla c=10µg/ml	Różnica [11]-[5] $\Delta A_{\Delta\lambda}$ [%]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Adenina		262.5	12600	0.900 ^a							
2	Guanina		249	11100	0.475 ^b							
3	Uracyl		260	8150	0.590 ^a							
4	Tymina		265	7950	0.549 ^a							
5	Cytoszyna		276	10000	0.863 ^b							