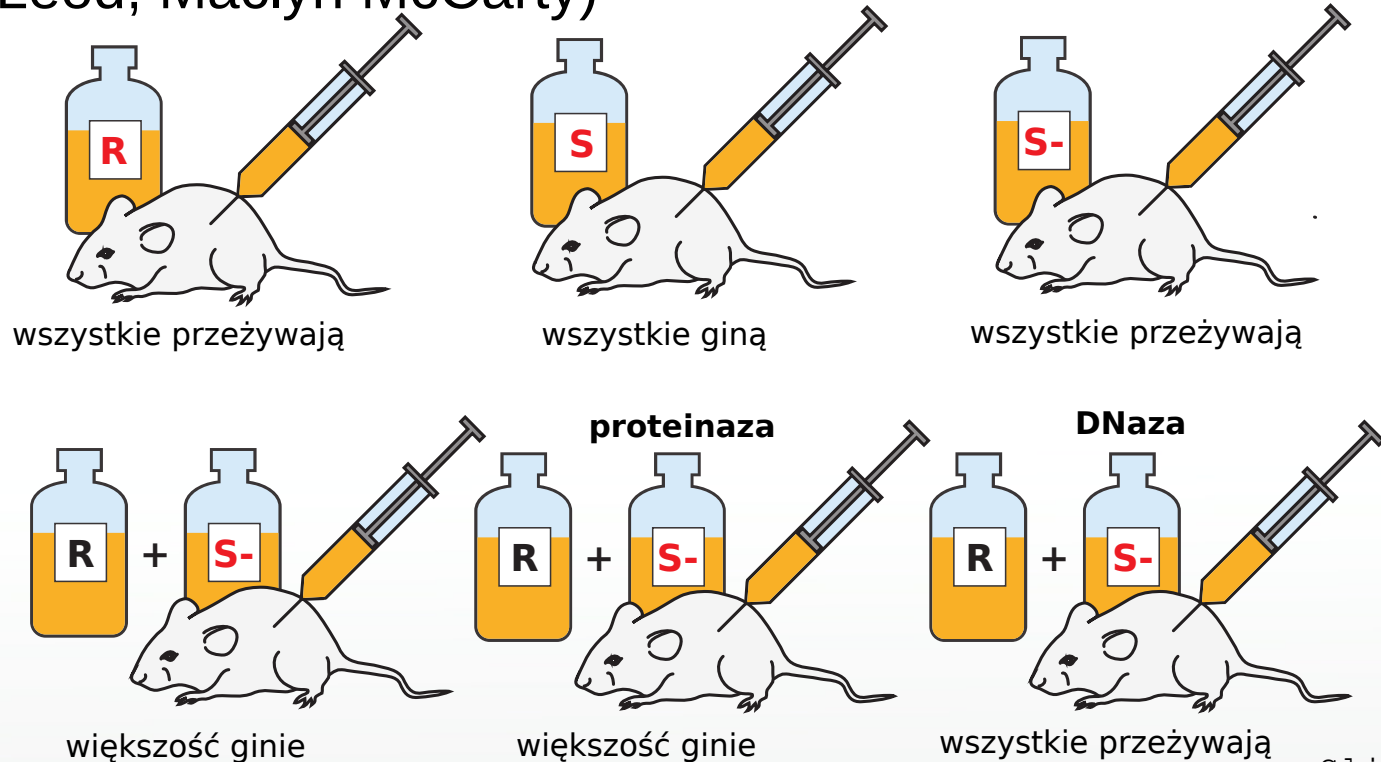
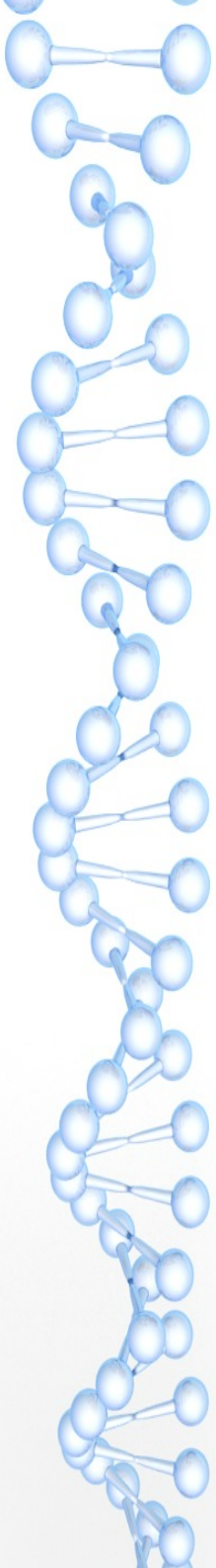


Budowa kwasów nukleinowych

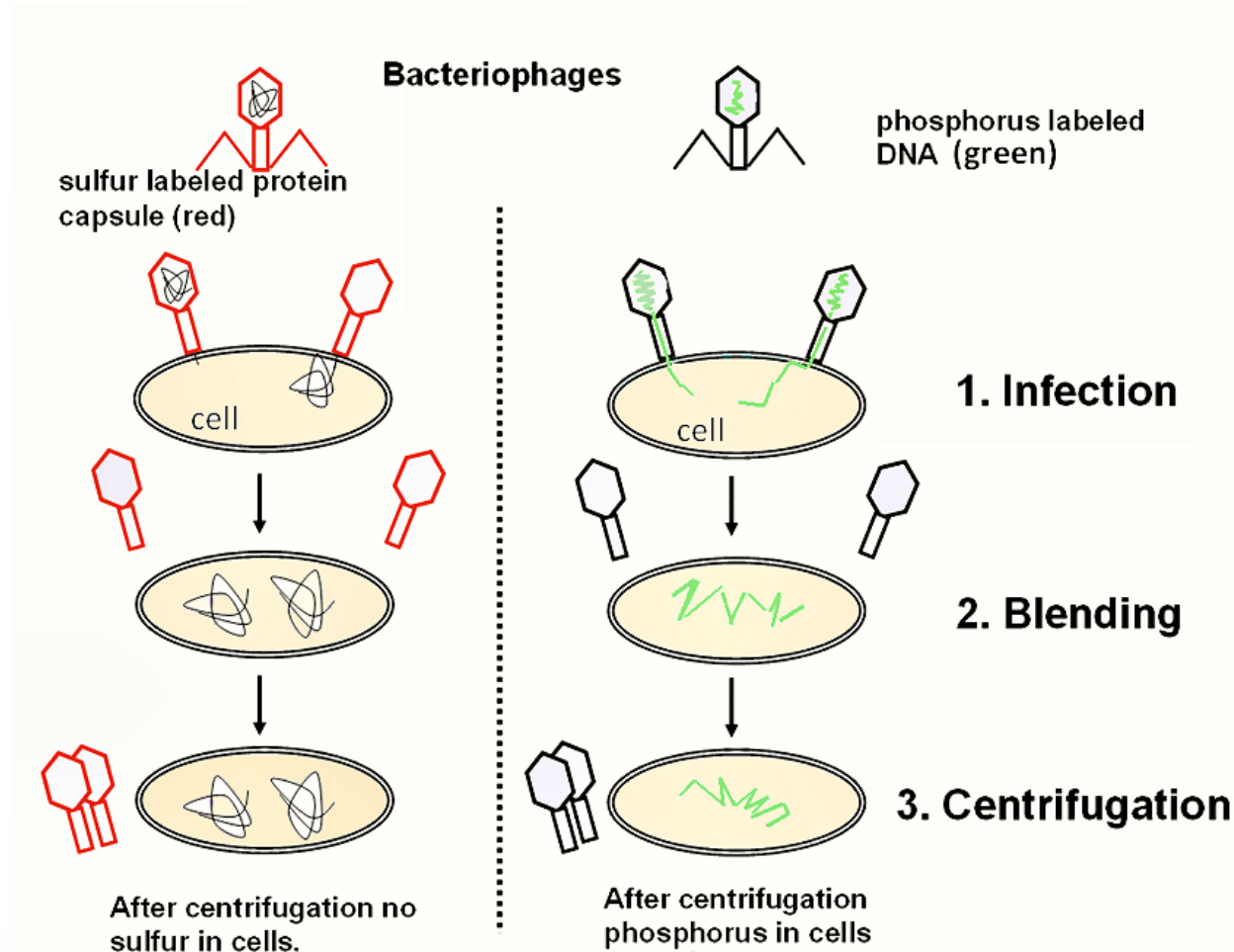
Trochę historii

- 1869 r. - odkrycie DNA (Johannes Friedrich Miescher)
- 1903 r. - powiązanie praw Mendla z chromosomami (Walter Sutton)
- 1915 r. - chromosomowa teoria dziedziczności (Thomas Hunt Morgan)
- 1944 r. - doświadczenia z czynnikiem transformującym bakterie *Streptococcus pneumoniae* (Oswald Avery, Colin MacLeod, Maclyn McCarty)





- 1952 r. - wykazano, że to DNA bakteriofagów T2 wnika do komórek infekowanych przez nie bakterii (Alfred Hershey i Marta Chase)



wg. Thomasiene, Wikipedia

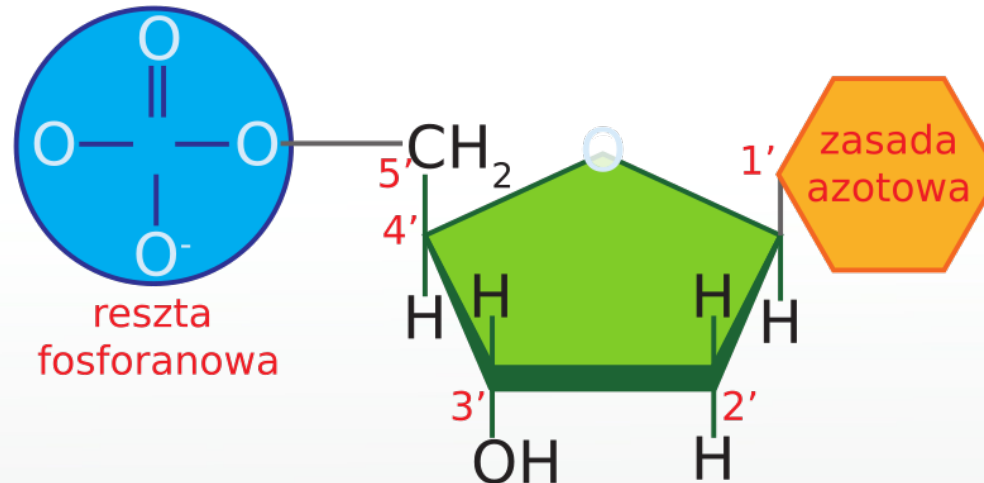
- 1953 r. - odkrycie struktury podwójnej helisy DNA (James Watson i Francis Crick)

Kwasy nukleinowe

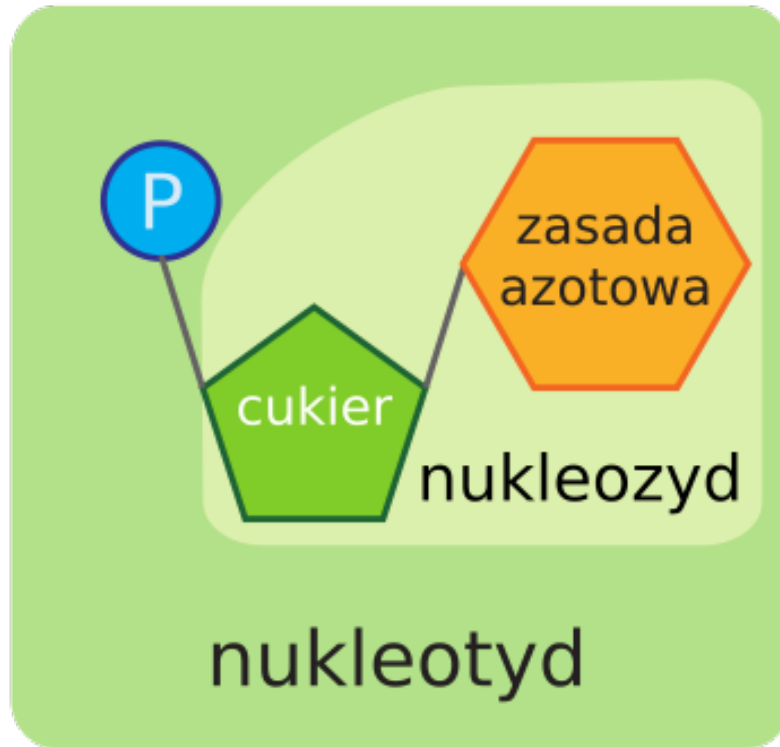
- DNA, RNA
- liniowe, nierozgałęzione polimery
- monomerem jest nukleotyd

Nukleotyd zbudowany jest z:

- zasady azotowej
 - puryna (adenina, guanina)
 - pirymidyna (cytozyna, tymina, uracyl)
- cukru (pentozy)
 - ryboza (RNA)
 - 2-deoksyryboza (DNA)
- 1-3 reszt kwasu fosforowego



Nukleotydy/nukleozydy

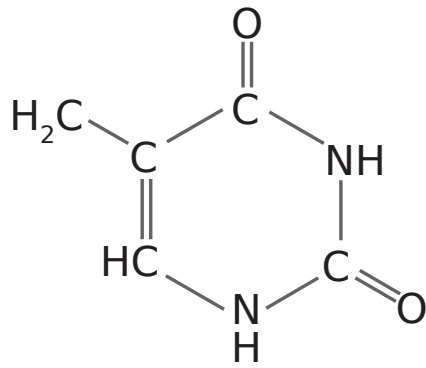


Jako substraty w syntezy DNA wykorzystywane są trifosforany nukleozydów:

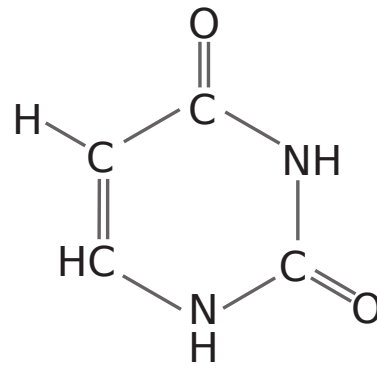
- * 2'-deoksyadenozyno-5'-trifosforan (**dATP**)
- * 2'-deoksytydyno-5'-trifosforan (**dCTP**)
- * 2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan (**dGTP**)
- * 2'-deoksytymidyno-5'-trifosforan (**dTTP**)

Zasady azotowe

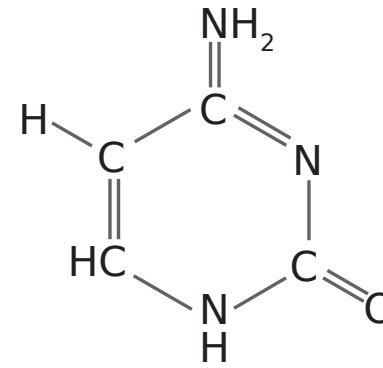
Pirymidyny



tymina (T)

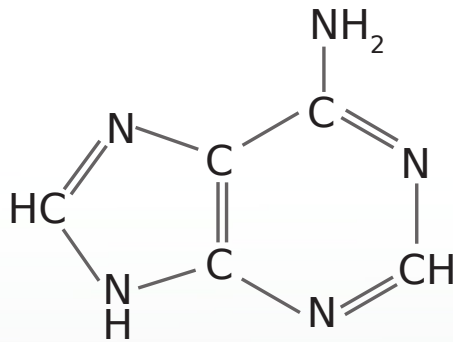


uracyl (U)

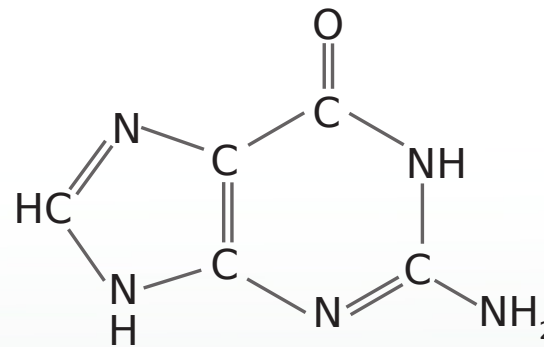


cytozyna (C)

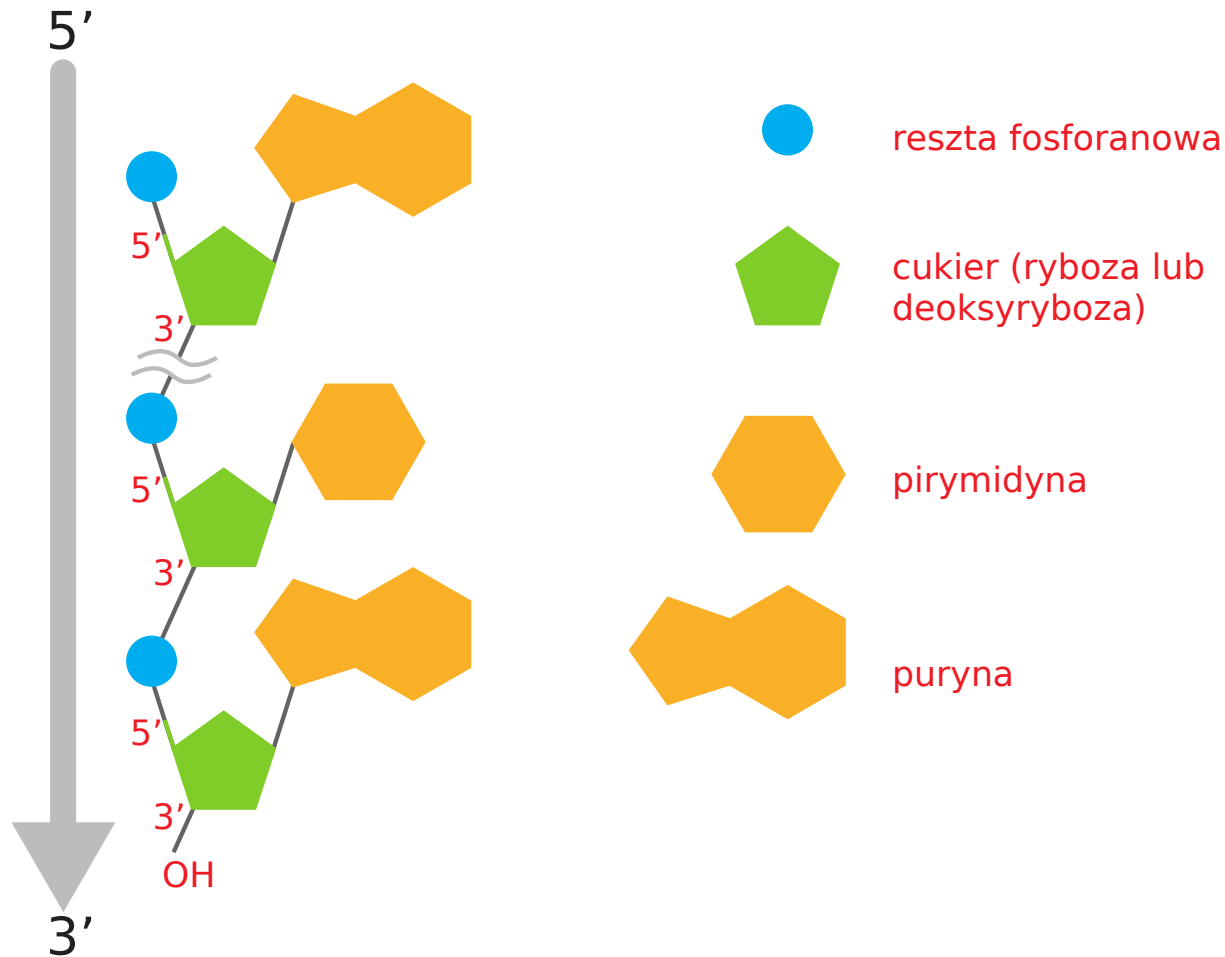
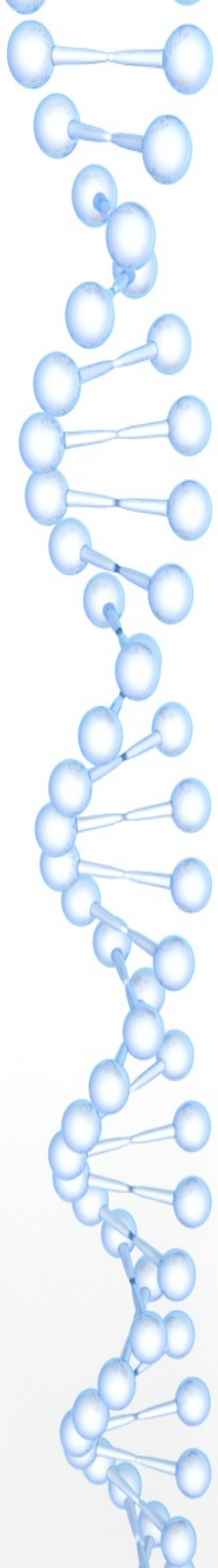
Puryny



adenina (A)

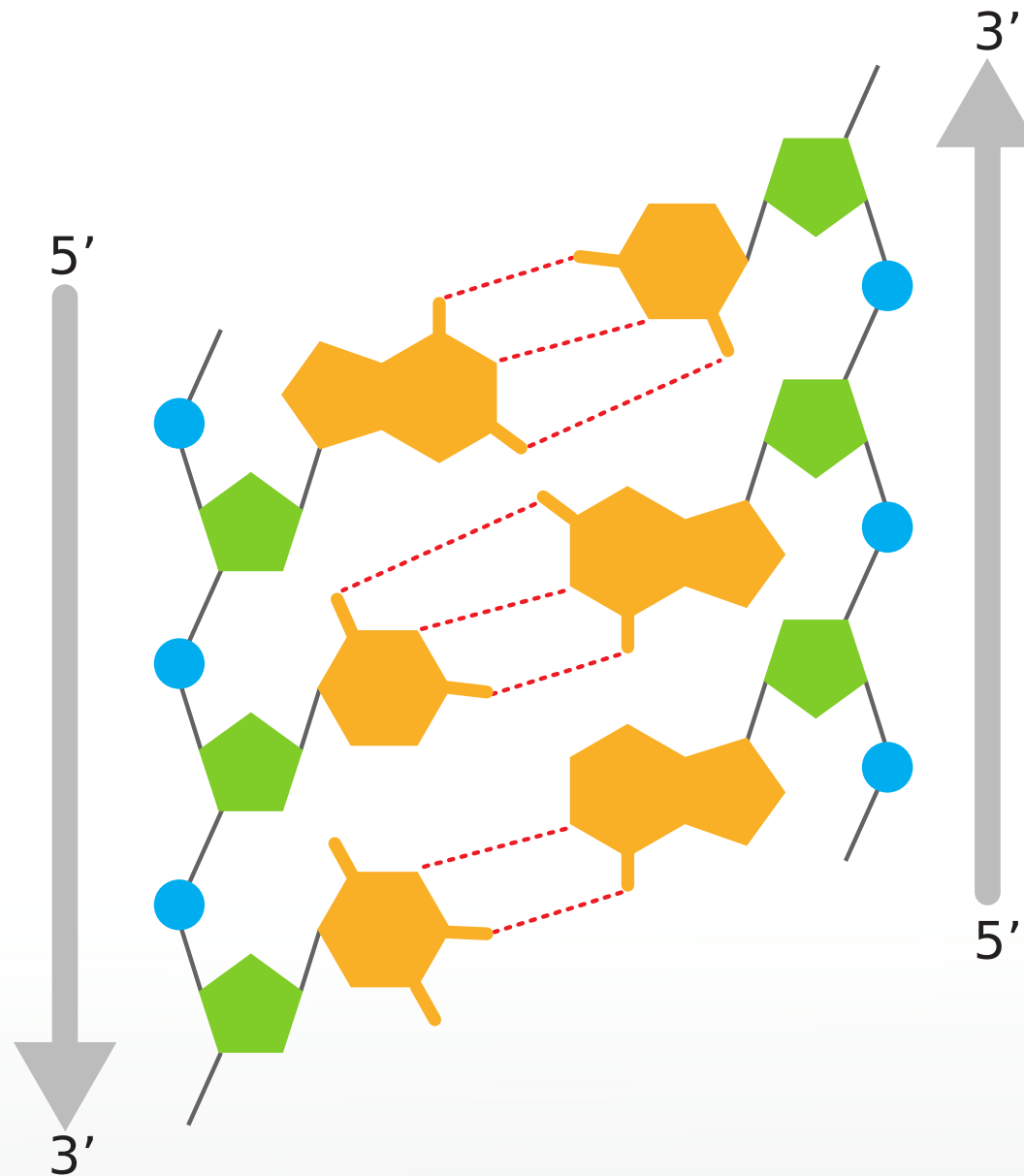


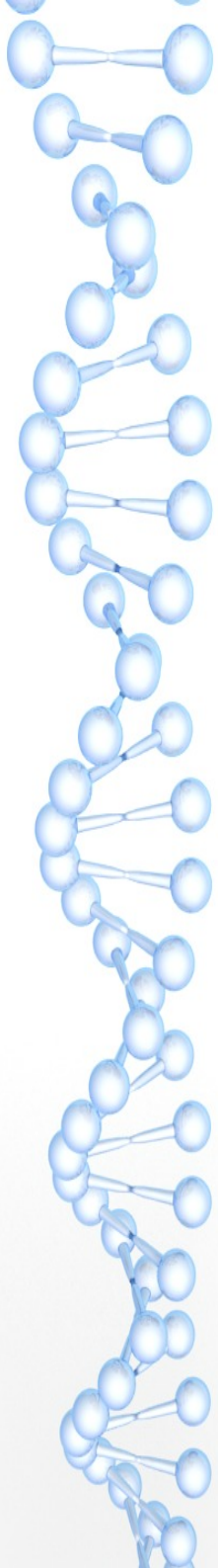
guanina (G)



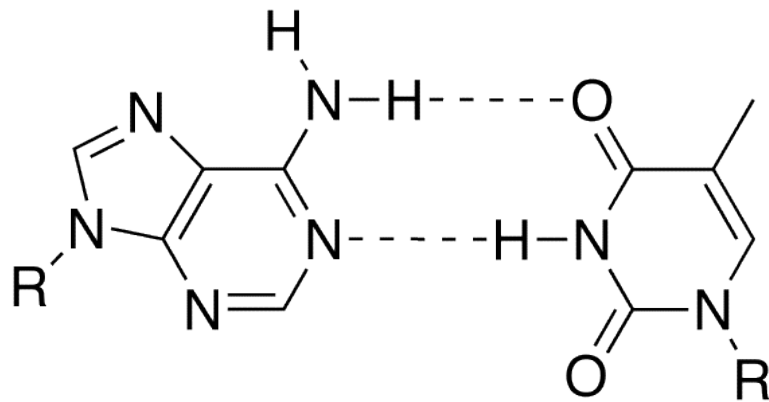
- nukleotydy połączone są wiązaniami fosfodiesterowymi - resztami fosforanowa łączy atom węgla w pozycji 5' jednej pentozy z atomem węgla 3' kolejnej
- koniec 5' - tam, gdzie atom węgla w pozycji 5' deoksyrybozy nie tworzy wiązania z kolejnym nukleotydem
- koniec 3' - tam, gdzie atom węgla w pozycji 3' deoksyrybozy nie tworzy wiązania z kolejnym nukleotydem
- polimerazy DNA przeprowadzają syntezę nowej nici w kierunku 5' → 3'

Łańcuchy w DNA są antyrównoległe



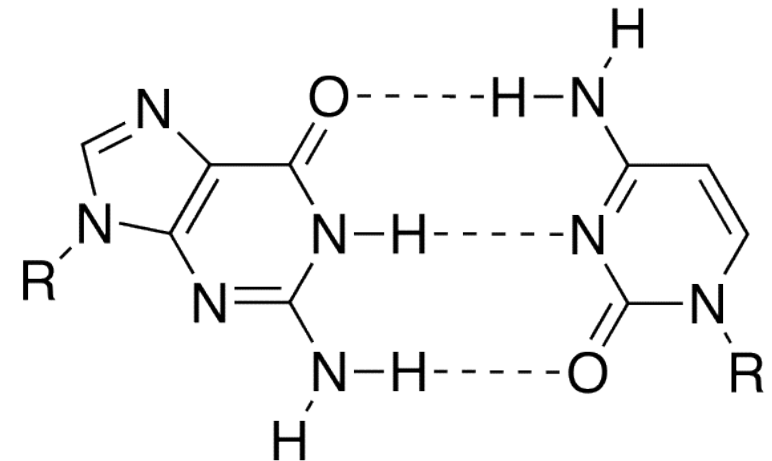


- dwie nici połączone są dzięki wiązaniom wodorowym występującym pomiędzy zasadami azotowymi z sąsiadujących łańcuchów
 - zawsze dwupierścieniowa puryna łączy się z jednopierścieniową pirymidyną, dlatego odległość nici jest stała
 - pomiędzy A i T występują 2 wiązania wodorowe
 - pomiędzy C i G występują 3 wiązania wodorowe



Adenine

Thymine



Guanine

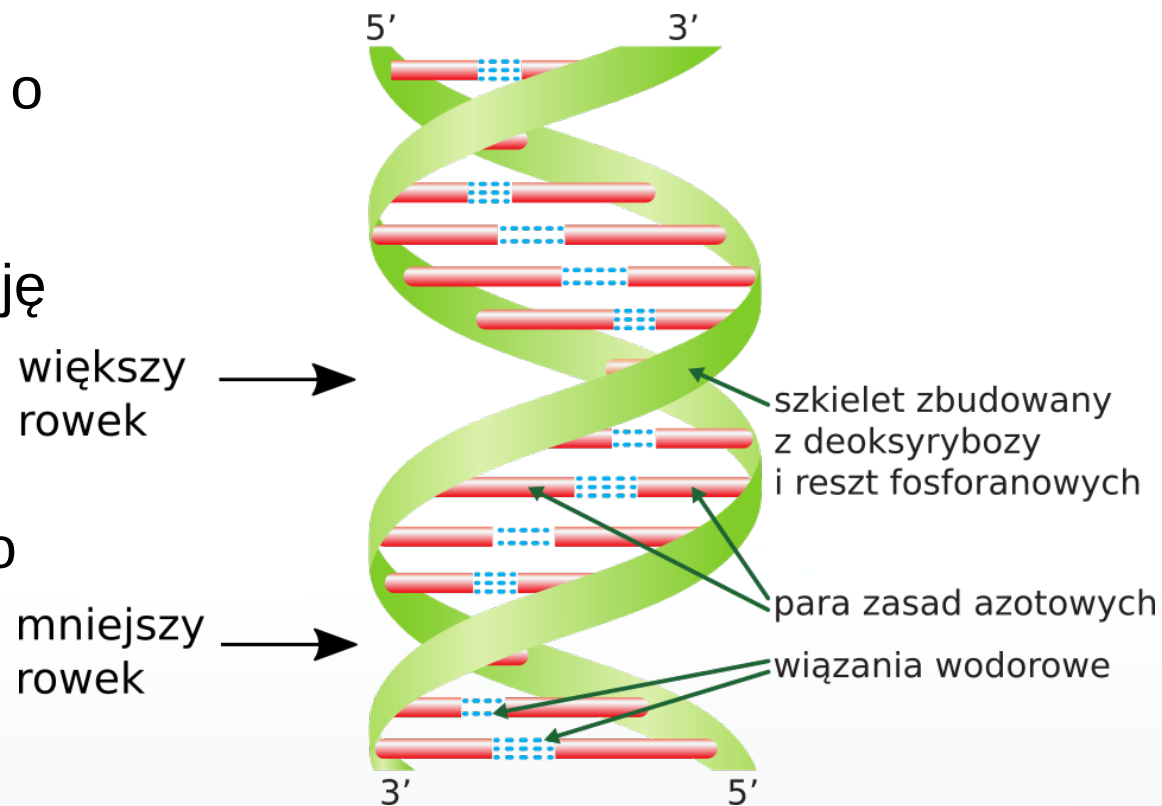
Cytosine

By Jypx3 (Own work) [Public domain], via Wikimedia Commons

- asocjacja warstwowa (oddziaływania typu π - π) - zwiększa stabilność podwójnej helisy na skutek oddziaływań hydrofobowych pomiędzy sąsiadującymi parami zasad

Podwójna helisa - forma B

- opisana przez Watsana i Cricka
- najczęściej występująca *in vivo*
- obecność 2 rowków: mniejszego i większego (decydują o dostępie białek wiążących DNA i regulujących ekspresję genów)
- prawoskrętna
- pary zasad położone są w osi helisy i są do niej prawie prostopadłe
- średnica: 2,37 nm
- skok helisy: 3,4 nm
- liczba zasad na skręt: 10



Inne typy helis

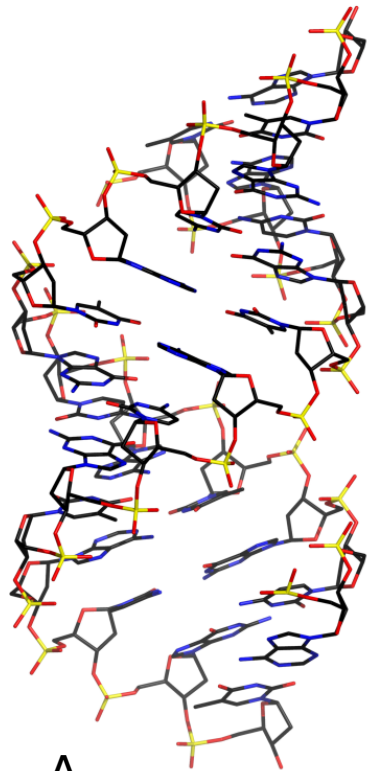
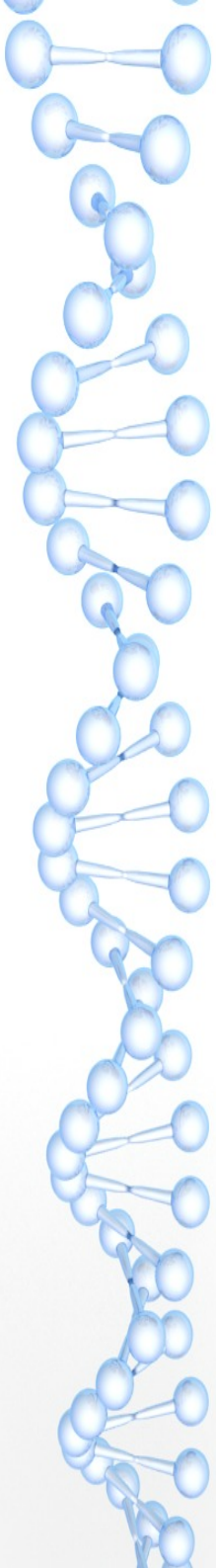
Zmiany konformacji wynikające głównie z rotacją wokół wiązania β -N-glikozydowego oraz obrotu wokół wiązania między atomami węgla 3' i 4' reszty cukrowej umożliwiają występowanie innych typów helis DNA:

- **forma A**

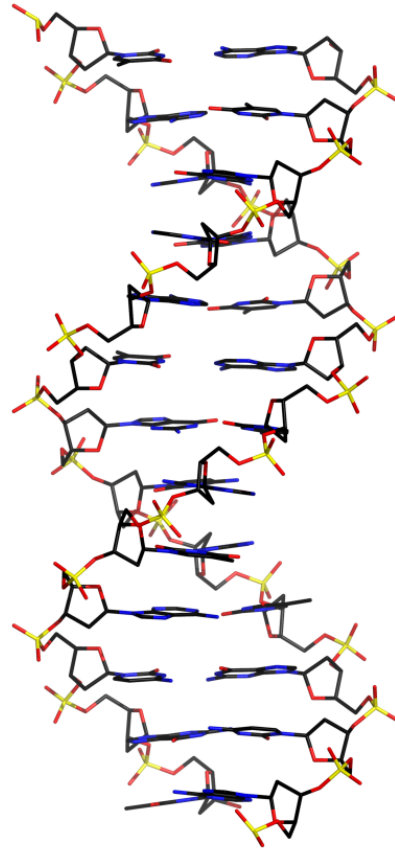
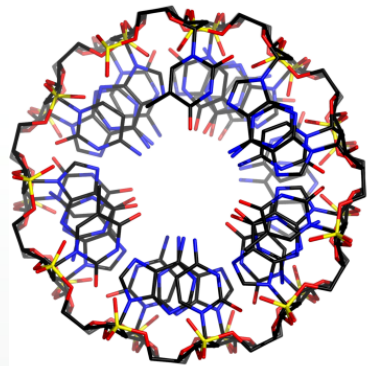
- prawoskrętna
- posiada 2 rowki, jeszcze bardziej różniące się głębokością niż w formie B
- pary zasad leżą poza osią helisy i są od niej odchylone
- występuje w cząsteczkach hybrydowych (DNA/RNA) i tam gdzie RNA przyjmuje strukturę drugorzędową
- średnica: 2,55 nm
- skok helisy: 3,2 nm
- liczba zasad na skręt: 11

- **forma Z**

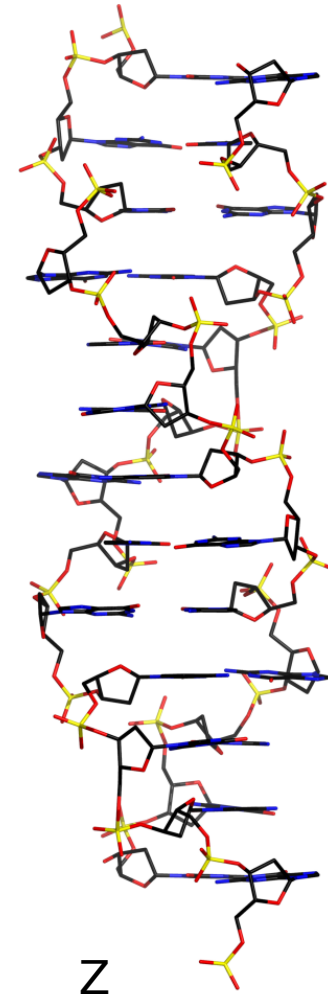
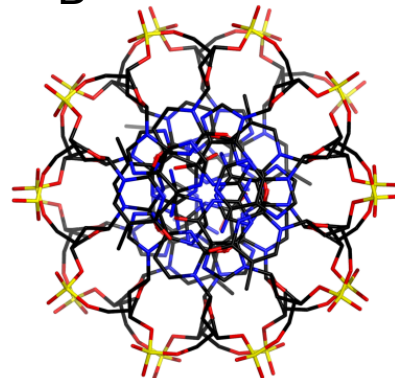
- lewoskrętna
- występuje tylko w specyficznych sekwencjach składających się z występujących po sobie reszt pirymidynowych i purynowych
- prawdopodobnie nie odgrywa znaczącej roli *in vivo*
- średnica: 1,84 nm
- skok helisy: 4,5 nm
- liczba zasad na skręt: 12



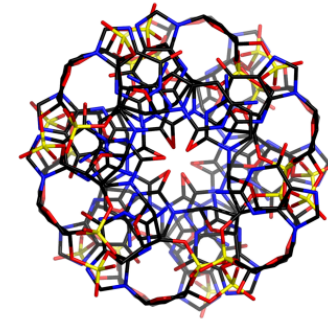
A



B



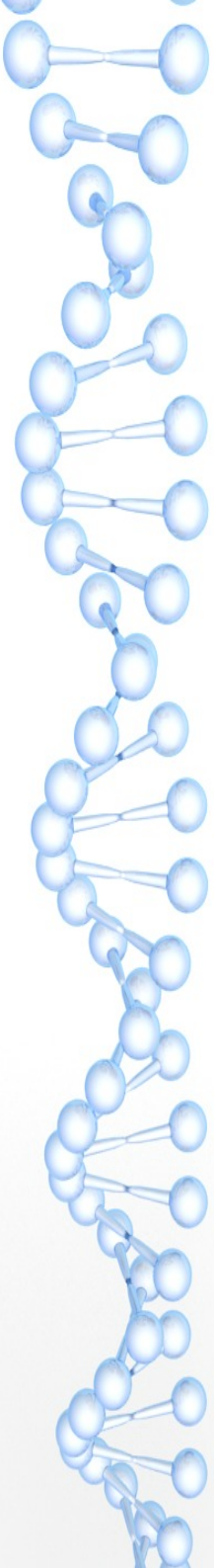
Z



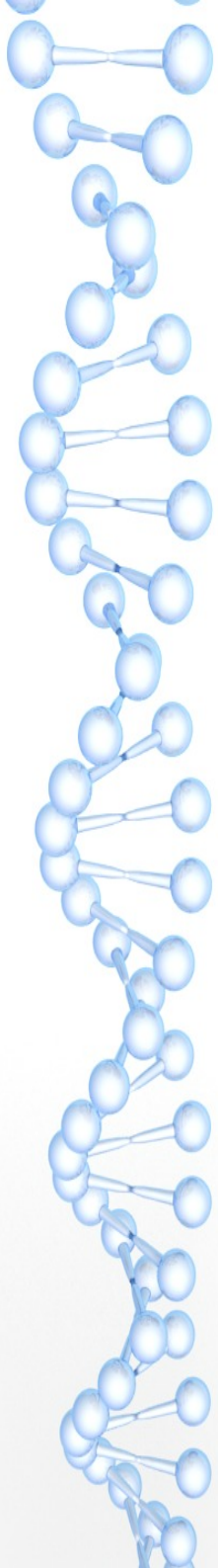
Zapis sekwencji DNA

- w kierunku od końca 5' do 3', np. 5'-ATGGTCAGTTA-3'
- podaje się sekwencję nici "+", czyli tej której sekwencja odpowiada nici RNA
- stosuje się kod IUPAC:

- › **A** - adenina
- › **T (U)** - tymina (uracyl)
- › **C** - cytozyna
- › **G** - guanina
- › **R** - A lub G
- › **Y** - C lub T
- › **S** - G lub C
- › **W** - A lub T
- › **K** - G lub T
- › **M** - A lub C
- › **B** - C lub G lub T
- › **D** - A lub G lub T
- › **H** - A lub C lub T
- › **V** - A lub C lub G
- › **N** - A lub C lub G lub T
- › **- (.)** - przerwa



Izolacja DNA



Materiała do izolacji DNA oraz jego przechowywanie

Najszybciej do izolacji DNA wykorzystuje się:

- w przypadku zwierząt i człowieka: krew, komórki nabłonka
- w przypadku roślin: młode liście, siewki
- w przypadku szczątków paleontologicznych i archeologicznych: czaszka, kości i zęby

Przechowywanie materiału do izolacji DNA

- zamrożenie materiału w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- zasuszenie materiału w żelu krzemionkowym (np. w przypadku liści)
- liofilizacja



Wybór metody izolacji DNA

- rodzaj materiału z jakiego będzie izolowane DNA
- rodzaj DNA jaki chcemy otrzymać (całkowite, jądrowe, organellowe, mitochondrialne, plazmidowe itp.)
- do jakich analiz ma posłużyć otrzymany preparat DNA - jaka ilość i jakość DNA jest potrzebna do dalszych analiz
- koszt i czasochłonność procedury



Wśród istniejących metod izolacji DNA można wyróżnić m. in.:

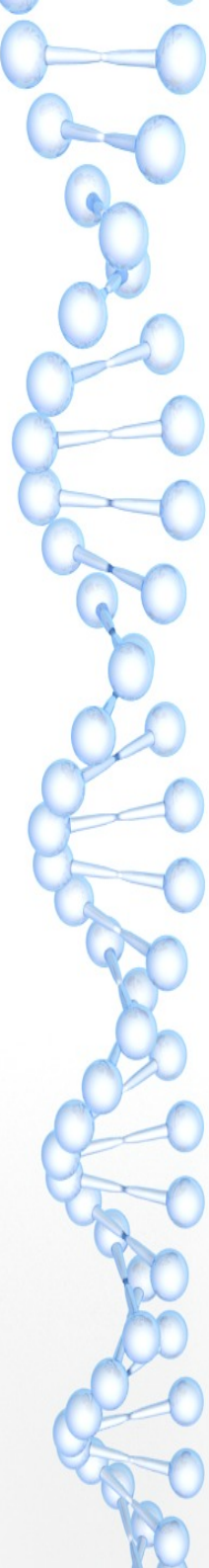
- metody oparte na ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (np. fenolem lub mieszaniną chloroformu z alkoholem izoamylowym)
- metody oparte na wiązaniu DNA do przez złoża krzemionkowe - wykorzystujące zdolność wiązania DNA przez te złoża w obecności soli chaotropowych

Sole chaotropowe (np. chlorowodorek guanidyny lub izotiocyanian guanidyny) są to związki zaburzające strukturę wody poprzez oddziaływanie na występujące w niej wiązania wodorowe. Sole chaotropowe powodują też rozpad błon i denaturację białek, co również jest korzystne podczas izolacji DNA.



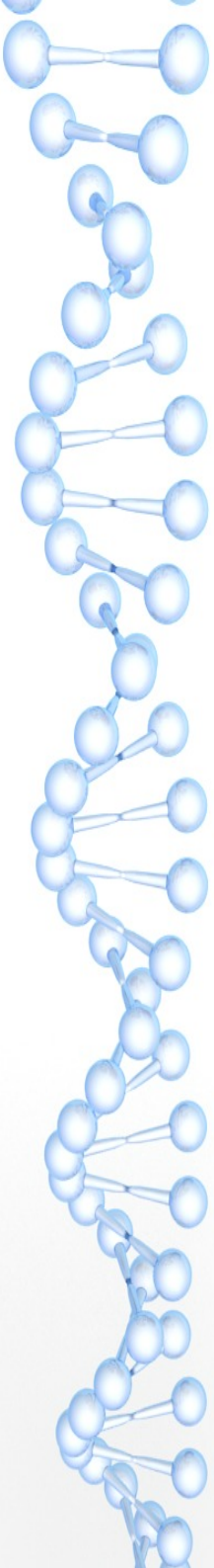
Etapy izolacji DNA opartej na ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi

1. Zniszczenie struktury komórkowej
 - mechaniczne (np. ucieranie tkanki w ciekłym azocie)
 - enzymatyczne (np. lizozym do trawienia bakteryjnych ścian komórkowych)
 - chemiczne (np. zastosowanie detergentów do niszczenia błon komórkowych)
2. Ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi (np. mieszanina chloroformu z alkoholem izoamyłowym)
3. Strącanie DNA przy użyciu izopropanolu lub etanolu
4. Płukanie osadu DNA
5. Wysuszenie i ponowne rozpuszczenie DNA w wodzie lub buforze TE



Etapy izolacji DNA opartej na na wiązaniu DNA do przez złoża krzemionkowe (kolumnienki)

1. Zniszczenie struktury komórkowej
2. Związanie DNA ze złożem znajdującym się w kolumnie
3. Płukanie złoża
4. Elucja DNA



Ocena jakości DNA

- › elektroforeza w żelu agarozowym
- › spektrofotometria

Przechowywanie DNA

- › krótkoterminowo: +4 °C
- › długoterminowo: -20 °C