

ACIZI NUCLEICI. STRUCTURĂ. PROPRIETĂȚI

Introducere

Acizii nucleici, constituenți universali ai viului, sunt molecule informaționale cu rol în stocarea, transmiterea și exprimarea mesajului genetic, unele structuri ARN (ribozim) având și rol catalitic. Ei reprezintă cele mai importante molecule din celulă, asigurând prin ADN banca de date și centrul de coordonare al celulei, iar prin ARN punerea în aplicare a comenzilor date de ADN-ul nuclear.

Funcțiile ADN cuprind atât menținerea vieții celulei în condițiile schimbătoare ale mediului extracelular cât și transmiterea nealterată a tuturor caracteristicilor celulei mamă la celula fiică, în cursul diviziunii celulare.

Din punct de vedere chimic, acizii nucleici sunt catene polinucleotidice cu masă moleculară mare, în care unitățile de bază, nucleotidele, sunt legate între ele prin legături 3', 5'-fosfodiesterice.

O nucleotidă are în compoziție:

- o bază azotată (purinică sau pirimidinică)
- o pentoză (riboza sau dezoxiriboza)
- o moleculă de acid fosforic

Molecula de ADN se prezintă sub forma a două catene polinucleotidice complementare, orientate antiparalel, legate între ele prin legături de hidrogen între bazele azotate complementare (adenină-timină, guanină-citozină). Catenele sunt răsucite spre dreapta, în jurul unui ax imaginar, constituind o structură în dublă elice.

Partea experimentală

A. Compoziția acizilor nucleici

Principiu

Acizii nucleici, ADN sau ARN, în mediu de acizi concentrați, la cald, hidrolizează în componentele de bază: baze azotate, acid fosforic și pentoze. Acestea pot fi identificate prin reacții specifice.

Reactivi

- acid percloric 0,5 N
- ADN sau ARN, preparate comerciale.
- Amoniac 25%
- Acid azotic concentrat 65% (densitate 1,40)
- Molibdat de amoniu 5%
- NaOH 10%
- Reactiv Fehling I (70 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se completează cu apă la un volum final de 1000 ml)
- Reactiv Fehling II (se dizolvă 150 g sare Seignette în aproximativ 600 ml apă, se adaugă 300 ml soluție NaOH 25 % și se completează cu apă distilată la 1000 ml)

- Reactiv Fehling de lucru (se prepară la nevoie amestecând în raport volumetric de 1:1, reactivul Fehling I cu reactivul Fehling II)
- Azotat de argint 5%

Mod de lucru

1. Obținerea hidrolizatului de acid nucleic

Circa 50 mg acizi nucleici (ARN sau ADN), se trec într-o eprubetă în care se mai adaugă 5 ml acid percloric 0,5 N. Eprubeta se ține în baie la fierbere timp de 30 de minute, apoi se răcește rapid. În caz că hidrolizatul nu este limpede, se trece într-o eprubetă de centrifugă și se centrifughează timp de 10 minute la 5000 g. Supernatantul limpede astfel obținut va fi folosit la identificarea componentelor acizilor nucleici.

2. Identificarea acidului fosforic

Se introduc 1 ml de hidrolizat într-o eprubetă. Se alcalinizează cu 0,50 ml amoniac 25%, apoi se acidulează cu 0,50 ml acid azotic concentrat. Probei omogenizate i se adaugă 1 ml soluție molidat de amoniu 5%. Se introduce timp de 5 minute în baia de apă la fierbere. Apariția unui precipitat galben de fosfomolibdat de amoniu, indică prezența ionului fosfat în probă.

3. Identificarea pentozelor

Se măsoară 1 ml hidrolizat într-o eprubetă. Se adaugă 0,80 ml NaOH 10% , apoi 2 ml reactiv Fehling de lucru. Se mențin eprubetele 5 minute în baia de apă la fierbere. Apariția unui precipitat roșu de oxid cupros indică prezența componentei glucidice.

4. Identificarea bazelor azotate

Într-o eprubetă peste 0,50 ml amoniac 10%, se adaugă 2,0 ml hidrolizat, și 1,0 ml soluție azotat de argint 5%. Prezența bazelor azotate este semnalată de apariția lentă, în decurs de 10 – 15 minute, a unui precipitat brun – albicios de compuşii argentici ai bazelor purinice.

B. Absorbția în UV a acizilor nucleici. Denaturarea acizilor nucleici

Principiu

Toți acizii nucleici, nucleozidele și nucleotidele, absorb intens radiația ultravioletă, proprietate datorată absorbției date de bazele azotate. Spectrul în UV al unui acid nucleic este suma spectrelor bazelor azotate. Absorbția maximă are loc la $\lambda=260$ nm, fiind proporțională cu concentrația acidului nucleic (Figura 1).

În general o soluție de 1 mg/ml de acid nucleic nestructurat secundar (cu o catenă liniară) are A_{260} de 25, la pH neutru, pentru o grosime a stratului de soluție de un centimetru.

Structura secundară reduce absorbția UV, deoarece bazele azotate, legate între ele prin legături de hidrogen, sunt mai puțin expuse. Astfel, o soluție de 1 mg/ml de acid nucleic cu structură secundară completă (ADN sau ARN_t nativ) are $A_{260} = 20$, în aceleași condiții.

Prin denaturarea ADN (la pH puternic acid sau alcalin sau la încălzire) se dezorganizează structura secundară, având loc creșterea A_{260} , fenomen numit efect hipercromic. La renaturarea ADN (revenire la pH neutru, răcire soluție) se restabilește structura secundară, scăzând A_{260} , fenomen numit efect hipocromic. Temperatura la care jumătate din ADN este denaturat se numește temperatură de topire a ADN, T_m (Figura 2). Temperatura de topire reprezintă energia necesară ruperii legăturilor de hidrogen dintre bazele azotate, legături ce stabilizează structura secundară. Ca urmare T_m va crește cu creșterea conținutului guanină-citozină, care formează trei legături de hidrogen. Valoarea medie a T_m este de 70 - 75 °C.

Reactivi

- ◆ Soluție ADN 1 mg/ml. Soluția se diluează până când A_{260} devine $\cong 1,0$
- ◆ Materiale
- ◆ Spectrofotometru UV

Mod de lucru

Trasarea spectrului de absorbție în UV al soluției de ADN

Trasarea spectrului de absorbție se face în funcție de aparatura de care se dispune. Dacă se dispune de aparatură automată trasarea spectrului se face în regim automat. Dacă nu, se măsoară valorile absorbției între 200 și 300 nm notând absorbțiile din 5 în 5 nm. Se trasează pe hârtie milimetrică graficul dependenței absorbției în funcție de lungimea de undă

Soluția de ADN se încălzește 5 minute în baia de apă la fierbere. Se determină A_{260} , apoi se răcește repede soluția în apă rece. Se determină din nou A_{260} . Se discută rezultatele obținute.

Pentru preparate înalt purificate creșterea în absorbanță poate fi până la 40%.

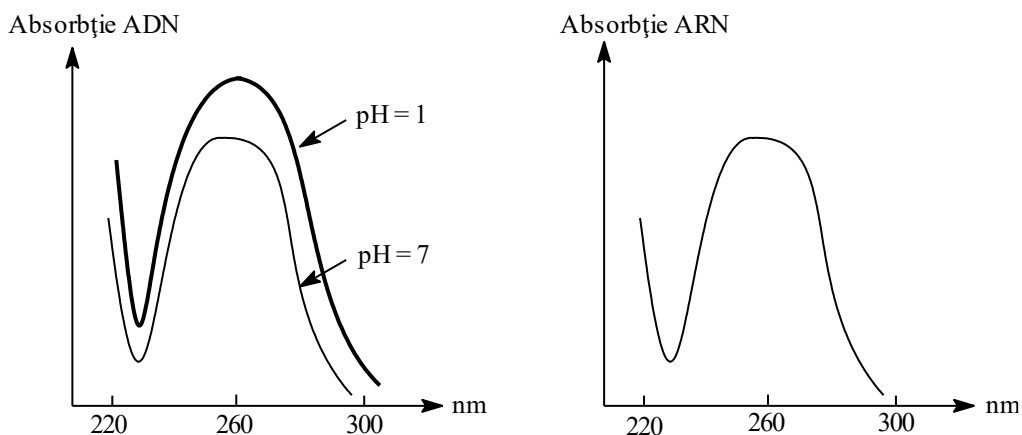


Figura 1. Caracteristici spectrale ale ADN și ARN

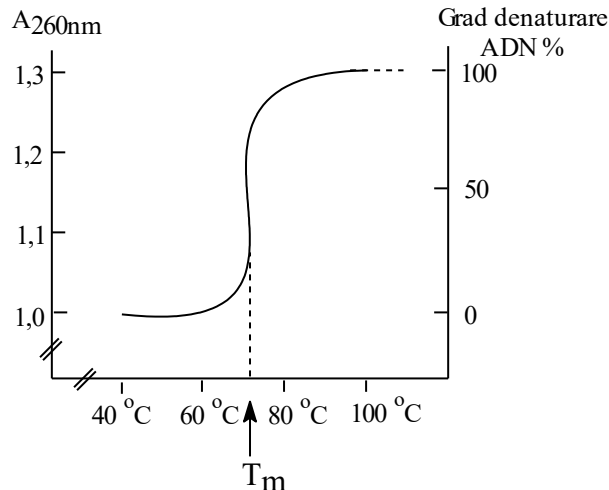


Figura 2. Curba de topire a ADN

Conținutul procentual în guanină (G) și citozină (C) poate fi calculat cu relația:

$$\%GC = 2.44 (T_m - 69.3)$$

pentru valori cuprinse între 30 – 70 %.

C. Determinarea purității și cantității ADN prin metoda spectrofotometrică

Principiu

Acizii nucleici absorb radiația UV la 260 nm, iar proteinele la 280 nm. Valoarea raportului dintre densitățile optice la 260 nm și la 280 nm este un indicator al purității soluției de acizi nucleici.

Reactivi

- ◆ Soluție TE : EDTA 1 mM în tampon Tris-HCl 10 mM, pH=8,00 (vezi pagina 6)
- ◆ ADN dizolvat în soluție TE

Mod de lucru

1. Soluția conținând ADN-ul de determinat, în cazul că a fost păstrată la rece este incubată 3 minute la 60°C
2. Se centrifughează soluția 20 secunde la 1000xg, apoi se pune la gheață.
3. Într-o cuvă spectrofotometrică, cu grosimea de 1 cm, se pun 2 ml soluție TE (martor)
4. Într-o altă cuvă identică se pun 1,99 ml soluție TE și 10 μ l soluție ADN (proba).
5. Se introduc cuvele în spectrofotometru, apoi se citește extincția probei la 260 nm și la 280 nm, față de martor înaintea fiecărei citiri.
6. Cele două citiri se vor nota cu E_{260} , respectiv E_{280} .

Rezultate și discuții

Se calculează raportul E_{260}/E_{280} . Preparatele pure au valoarea raportului de 1,8. Valorile semnificativ mai scăzute indică o contaminare cu proteine.

Prin metoda spectrofotometrică se poate determina cantitativ ADN-ul extras din diverse probe biologice. Determinarea se bazează pe faptul că la o valoare a extincției E_{260} de 1,00 îi corespunde o concentrație de aproximativ 50 $\mu\text{g/ml}$.

Exemplu : o probă de ADN izolat a fost diluată de 20 de ori pentru ca E_{260} să ajungă la valoarea de 0,8. Cantitatea de ADN din probă se va calcula astfel :

$$\mu\text{g ADN} / \text{ml} = \frac{0,80 \times 50}{1,00} \times 20$$