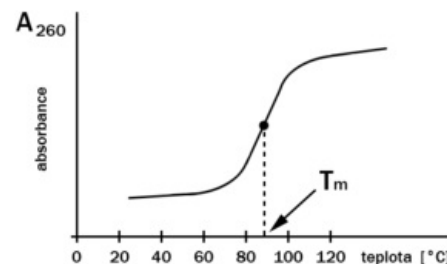


Denaturace nukleových kyselin, molekulární hybridizace

Vodíkové můstky ve dvouřetězcové DNA (double strand DNA, **dsDNA**), lze zrušit extrémním pH, močovinou nebo teplem. Následné oddělení řetězců, tj. **denaturaci DNA**, je možné sledovat pomocí tzv. **hyperchromního efektu**. Vlivem interakce elektronů v párovaných bazích roztoky dsDNA absorbují UV světlo (při 260 nm) méně, než stejná koncentrace bazí v mononukleotidech nebo v jednořetězcové DNA (single strand DNA, **ssDNA**). Zahřívá-li se roztok dsDNA, pak při určité teplotě absorbance náhle stoupne. Teplota, při které vzestup absorbance dosáhne své poloviny, se nazývá **bod tání DNA** (melting point, **T_m**). Čím více párů G=C zkoumaná dsDNA obsahuje, tím vyšší je T_m. Tři vodíkové můstky v G=C vyžadují více tepelné energie než dva v A=T.



Denaturace nukleových kyselin

Denaturace DNA je reverzibilní. Komplementární ssDNA se např. při poklesu teploty nebo snížení koncentrace močoviny mohou opět spojit v dsDNA. Rozplétání a splétání dvoušroubovice je *in vivo* běžným jevem (např. při biosyntéze nukleových kyselin). Spojování dvou komplementárních řetězců nukleových kyselin *in vitro* do dvoušroubovice se nazývá **reasociace**. Pokud reasociují různé typy nukleových kyselin (DNA s RNA), jde o **molekulární hybridizaci**. Metodicky se těchto jevů využívá k oddělení určité ssDNA nebo ssRNA ze směsi, k mapování genomu a ke zjištění poruch struktury genu (diagnostika genetických vad).

Technické uspořádání reasociace nukleových kyselin je různé. Nejdříve se např. na membránový filtr nebo na sacharidový gel v koloně naváže ssDNA o známé sekvenci, komplementární k nukleové kyselině hledané ve směsi. Při průtoku zkoumané směsi nukleových kyselin takto upraveným filtrem či kolonou se hledaná komplementární ssDNA nebo ssRNA asociuje s DNA fixovanou k nosiči. Po promytí lze zachycenou nukleovou kyselinu uvolnit (eluovat) vhodným činidlem rušícím vodíkové můstky.

Pro **diagnostické účely** se DNA pacienta (z lymfocytů, amniových buněk apod.) v definovaných místech nejdříve rozštěpí některou z restrikčních endonukleáz. Směs fragmentů se rozdělí gelovou elektroforézou. Pak se zjistí, zda-li některý z fragmentů DNA obsahuje určitou sekvenci nukleotidů, kritickou pro danou nemoc. Postupuje se tak, že fragmenty DNA se z gelového elektroforeogramu přenesou na materiál vhodnější k hybridizaci, tj. nitrocelulózový filtr. Tento filtr je třeba položit na suchý filtrační papír, na filtr přitisknout elektroforeogram a na tento gel přiložit filtrační papír navlhčený v koncentrovaném roztoku soli.

Elektroforetické frakce (fragmenty DNA) se „přepijákují“ (**blotting**) na nitrocelulózový filtr a denaturují se. Tím se vytvoří vhodné technické podmínky pro reasociaci komplementárních řetězců. Filtr se přelije roztokem radioaktivně značené a krátké umělé nukleové kyseliny, která obsahuje hledanou sekvenci. Tato tzv. **próba** se asociuje pouze s restrikčním fragmentem DNA obsahujícím komplementární sekvenci, což po opláchnutí filtru ukáže přiložená fotografická fólie (**autoradiografie**).

Uspořádání blottingu

POHLED Z BOKU



POHLED SHORA
(autoradiogram)
(nitrocelulózová fólie)



Uspořádání blottingu

Popsanou metodu analýzy restrikčních fragmentů DNA vypracoval Eduard M. Southern. Nese jeho jméno (**Southern blotting**) a je velmi rozšířena. Jestliže se

zcela analogickým způsobem hledá komplementární sekvence ve směsi blotovaných mRNA, mluví se o tzv.

Northern blottingu. Jméno pana Southerna (česky pana Jižního) se stalo obětí nomenklaturního vtipu (northern = severní). Imunochemici v této legraci pokračovali: při **western blottingu** (western = západní) se jedná o analogickou techniku, kde však interaguje antigen s protilátkou. V každém případě blotting představuje elegantní, rychlou a rutinně zvládnutelnou metodu.

Odkazy

Související články

- Struktura nukleových kyselin
- Základní složky nukleových kyselin
- Primární struktura nukleových kyselin
- Štěpení nukleové kyseliny hydrolýzou
- Metody sekvencování
- Sekundární struktura DNA
- Sekundární struktura RNA
- Topologie DNA
- Interakce DNA s proteiny

- Bakteriální chromozom
- Eukaryotické chromosomy
- DNA mitochondrií

*Další kapitoly z knihy ŠTÍPEK, S.: **Stručná biochemie uchování a exprese genetické informace**: [ukázat]*

• Řetězec nukleové kyseliny lze štěpit neenzymovou nebo enzymovou hydrolýzou • Metody sekvencování • **Sekundární a vyšší struktura nukleových kyselin:** Sekundární struktura DNA • Denaturace a reasociace řetězců nukleových kyselin, molekulární hybridizace • Sekundární struktura RNA • Topologie DNA; • Interakce DNA s proteiny, struktura chromosomu • Bakteriální chromosom • Eukaryotické chromosomy • DNA mitochondrií

Biosyntéza nukleových kyselin: Replikace DNA • Transkripce

Biosyntéza polypeptidového řetězce - translace: Transferové RNA (tRNA) • Aktivace aminokyselin, syntéza aminoacyl-tRNA • Funkce ribozómů v translaci • Translace u prokaryotů • Struktura ribozómů • Iniciace translace • Elongace peptidů • Terminace translace • Inhibitory bakteriální translace • Translace u eukaryotů • Struktura ribozómů • Iniciace eukaryotické translace • Elongace eukaryotické translace • Terminace eukaryotické translace • Inhibitory eukaryotické translace

Genetický kód

Biosyntéza nukleových kyselin a proteosyntéza v mitochondriích: Replikace mitochondriální DNA • Mitochondriální transkripce • Mitochondriální translace

Řízení genové exprese a proteosyntézy: Řízení genové exprese a proteosyntézy u prokaryot • Regulace na úrovni transkripce • Regulace sigma-faktory • Jacobův-Monodův operonový model • Regulační význam cAMP u bakterií • Variace operonového řízení genů • Tryptofanový a arabinosový operon • Řízení terminace transkripce • Regulace bakteriální proteosyntézy na úrovni translace • Řízení genové exprese a proteosyntézy u eukaryot • Regulace na úrovni uspořádání genů • Regulace na úrovni transkripce • Regulace posttranskripčních úprav pre-mRNA • Regulace na úrovni translace • Řízení rychlosti degradace mRNA • Regulace funkce proteinu kotranslačními a posttranslačními úpravami

Posttranslační úpravy a targeting proteinů: Signální sekvence polypeptidu, volné a vázané ribozómy • Posttranslační glykosylace proteinů • Targeting nezávislý na glykosylaci proteinů • Targeting mitochondriálních proteinů • Targeting jaderných proteinů • Rozhodovací mechanismus k destrukci nefunkčních proteinů • Receptorem zprostředkovaná endocytóza

Biochemie virů: Reprodukce DNA virů • Reprodukce RNA virů • Interferony

Biochemie genového inženýrství: Štěpení DNA na definovaném místě řetězce • Účinné dělení fragmentů DNA elektroforézou • Identifikace restričních fragmentů • Syntéza umělé DNA • Pomnožení a exprese izolovaného nebo umělého genu v hostitelské buňce

Zdroje

- ŠTÍPEK, Stanislav. *Stručná biochemie : Uchování a exprese genetické informace*. 1. vydání. Medprint, 1998. 92 s. s. 17-18. ISBN 80-902036-2-0.