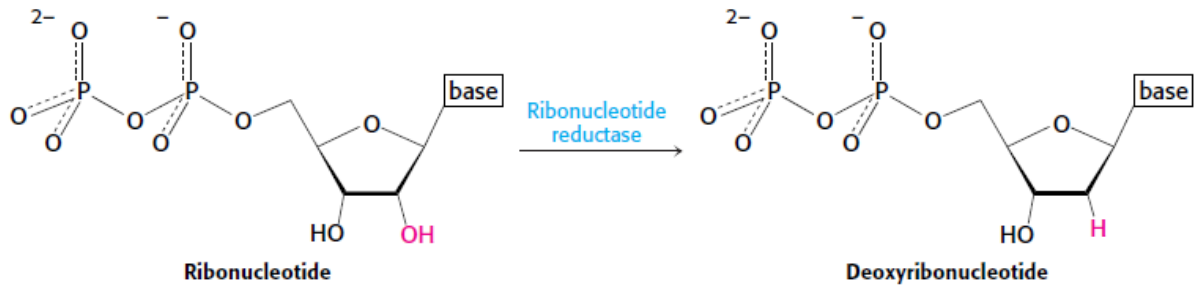


IZOLACIJA KROSMOSOMSKE DNA IZ VRANICE IN HIPERKROMNI EFEKT

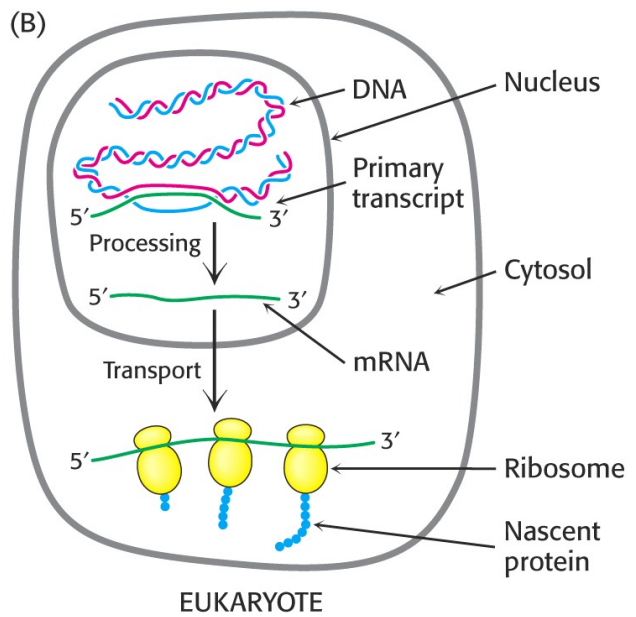
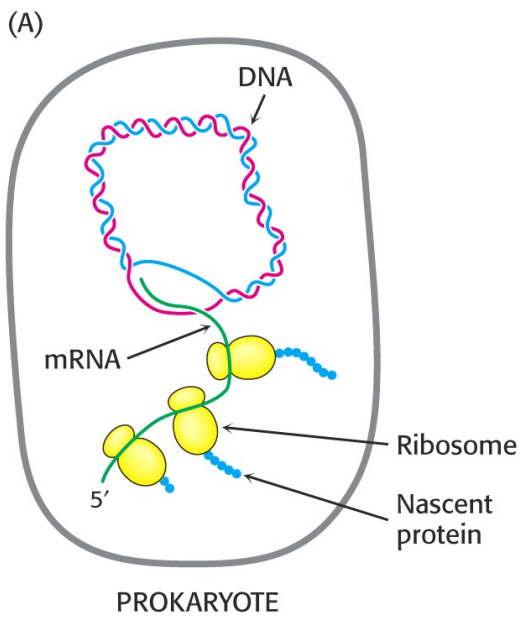
DNA $\xrightarrow{\text{transkripcija}}$ RNA $\xrightarrow{\text{translacija}}$ Protein

	DNA	RNA
ime	deoksirbonukleinska kislina	ribonukleinska kislina
nahajanje	jedro	jedro in citoplazma
baze	adenin, gvanin, citozin, TIMIN	adenin, gvanin, citozin, URACIL
sladkorji	deoksiriboza	riboza
struktura	dvojna vijačnica	enojna vijačnica
glavna funkcija	dolgoročno shranjevanje genetskih informacij	prenos informacij iz jedra v citoplazmo

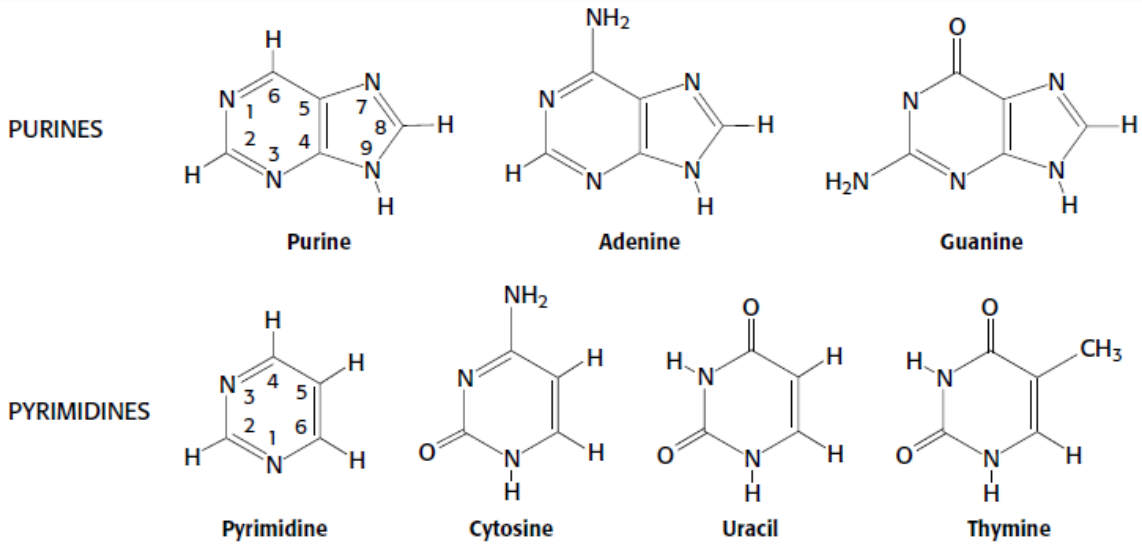
	DNA	RNA
ime	deoksirbonukleinska kislina	ribonukleinska kislina



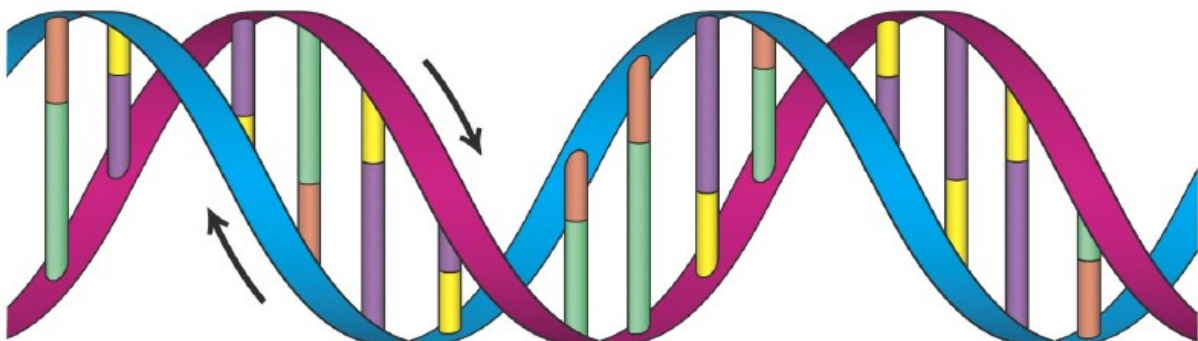
	DNA	RNA
ime	deoksirbonukleinska kislina	ribonukleinska kislina
nahajanje	jedro	jedro in citoplazma



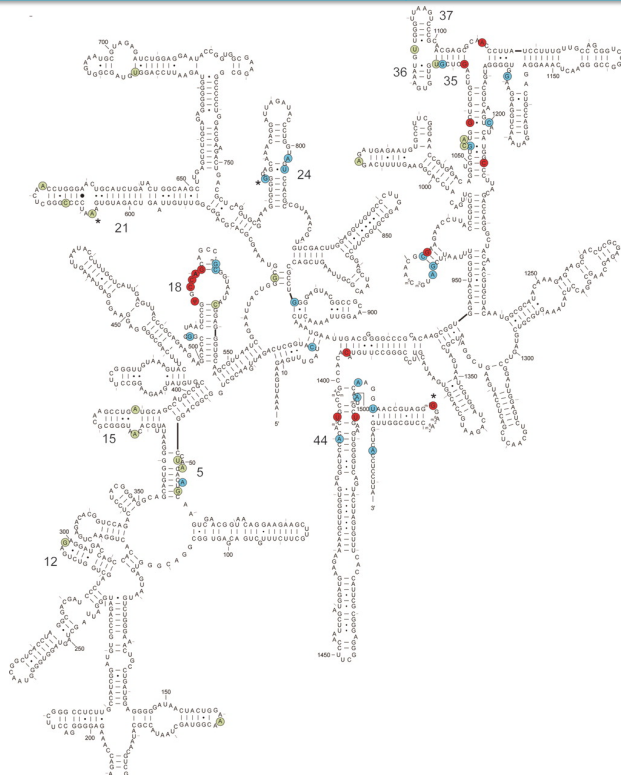
	DNA	RNA
ime	deoksirbonukleinska kislina	ribonukleinska kislina
nahajanje	jedro	jedro in citoplazma
baze	adenin, gvanin, citozin, TIMIN	adenin, gvanin, citozin, URACIL



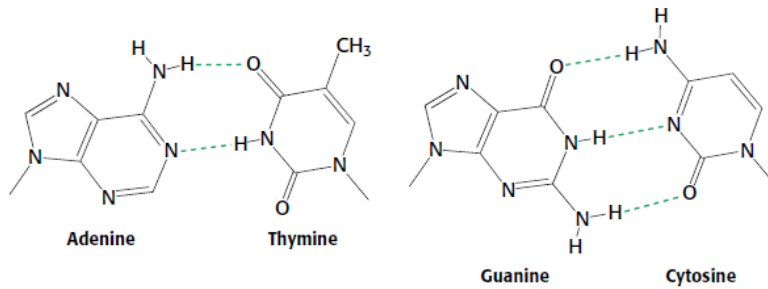
	DNA	RNA
ime	deoksirbonukleinska kislina	ribonukleinska kislina
nahajanje	jedro	jedro in citoplazma
baze	adenin, gvanin, citozin, TIMIN	adenin, gvanin, citozin, URACIL
sladkorji	deoksiriboza	riboza
struktura	dvojna vijačnica	enojna vijačnica



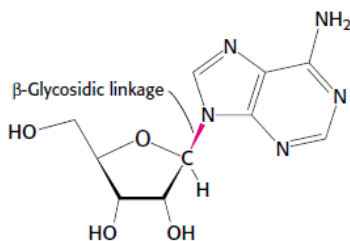
DNA		RNA
struktura	dvojna vijačnica	enojna vijačnica



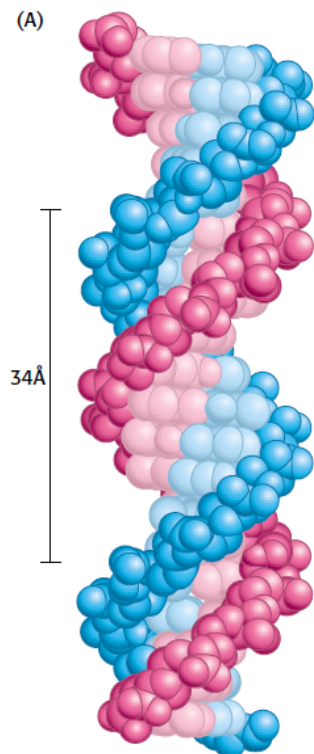
DNA je torej dvojna vijačnica, ki jo stabilizirajo **vodikove vezi** med posameznimi bazami znotraj vijačnice.



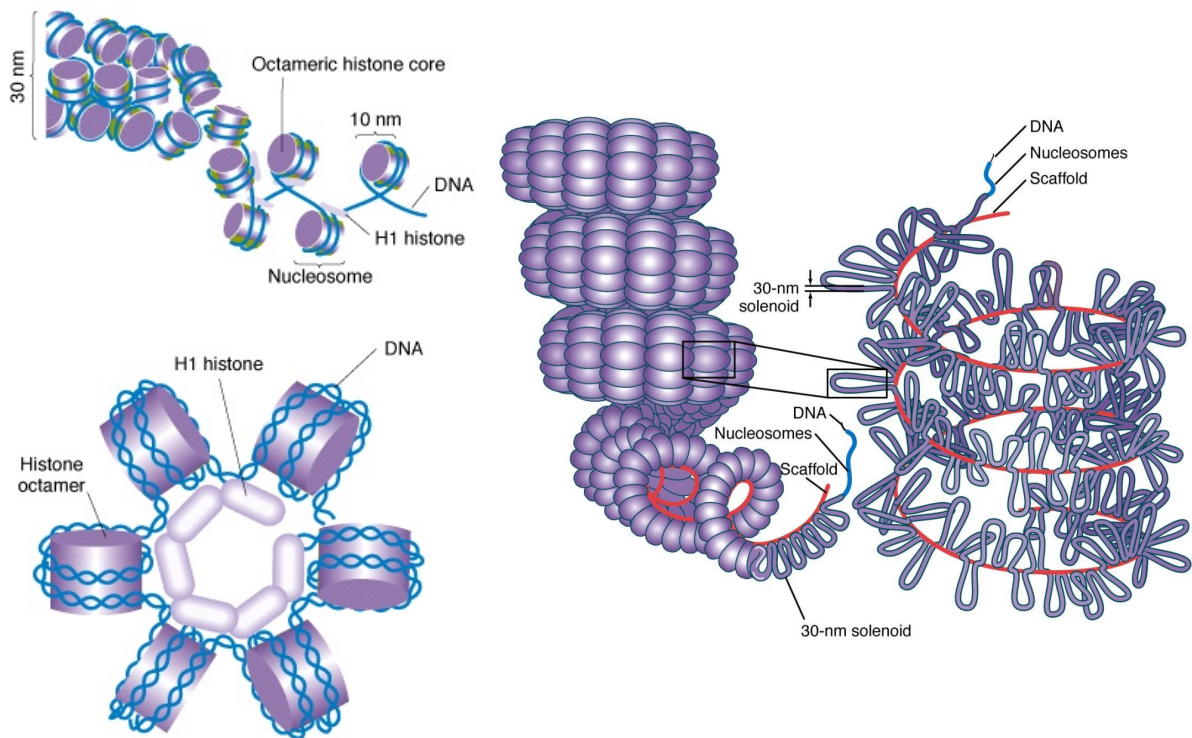
Nukleotidi se med seboj povezujejo z **fosfodiestersko** vezjo.



Baze in sladkorje pa povezuje **glikozidna vez**.



Histoni so **pozitivno** nabiti proteini, ki se nahajajo v jedru in omogočajo kompaktno pakiranje DNA.



IZOLACIJA EVKARIONTSKE DNA

Najprej je potrebno mehansko odstraniti biološki material (rastlinski ali živalski) :

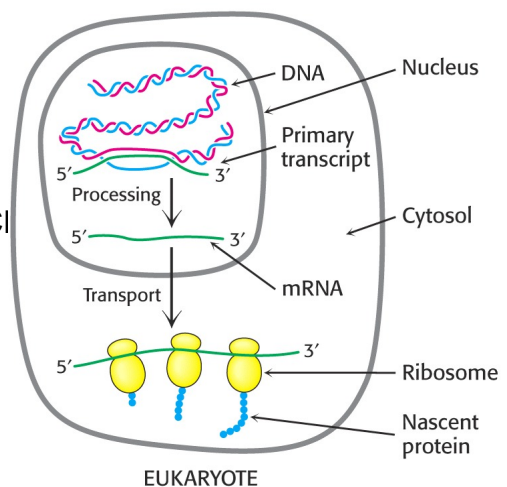
Tkivo homogeniziramo (teflonski homogenizer, rezilo z nožki) in centrifugiramo, da posedemo jedra, v katerih se nahaja DNA.

Potem je potrebno odstraniti predvsem:

1. **Lipide:** detergenti
2. **Proteine** (histoni): oslabimo povezave z NaCl
denaturacija z organskimi topili

Preprečiti pa moramo delovanje nukleaz:

- dodatek EDTA
- uporaba citratnega pufra
- delo pri nižjih temperaturah



PRECIPITACIJA (OBARJANJE) DNA

DNA je zaradi prisotnosti fosfatnih skupin na površini negativno nabita, kar pomeni, da je dobro topna v vodi.

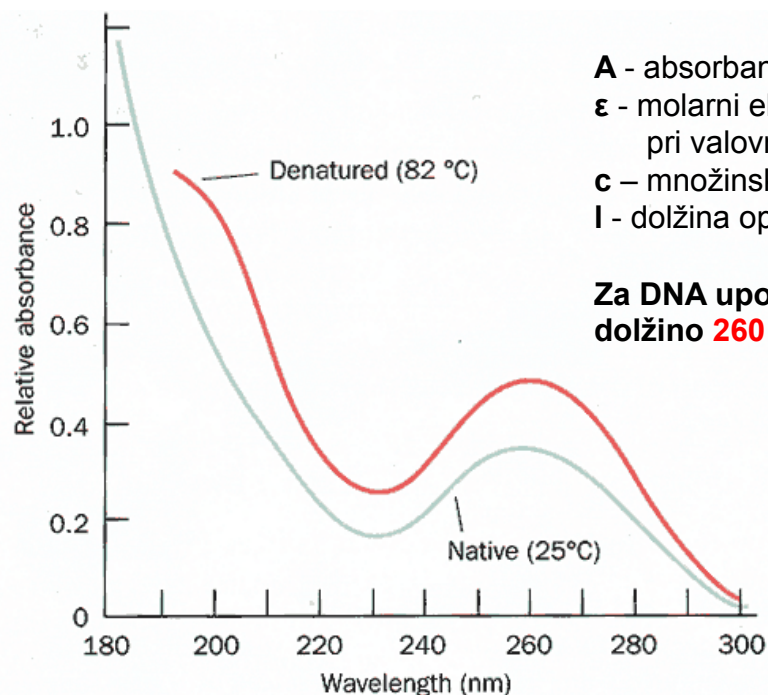
Voda je topilo z zelo visoko **dielektrično konstanto**, kar pomeni, da je električna sila med dvema nasprotno nabitima delcema v vodi precej manjša, kot bi bila v vakuumu.

Tudi če v vodo dodamo pozitivno nabite delce (ponavadi Na^+ , NH_4^+ ali Li^+), so vezi med fosfati in vodo še vedno močnejše od tistih med fosfati in pozitivnimi ioni, kar pomeni, da se DNA ne more oboriti.

Etanol ima precej nižjo dielektrično konstanto, kar pomeni, da je bolj hidrofoben. Če ga dodamo dovolj (več kot 70 % celotnega volumna, 95% etanol), postanejo ionske vezi med fosfatnimi skupinami in pozitivno nabitimi ioni močnejše kot vezi s topilom, kar pomeni, da se DNA obori iz topila.

Namesto etanola lahko uporabimo tudi izopropanol, ki ima še nižjo dielektrično konstanto, kar pomeni, da DNA obesimo hitreje, a ponavadi ko-precipitiramo še soli.

DOLOČANJE KONCENTRACIJE DNA



A - absorbanca pri valovni dolžini λ
 ϵ - molarni ekstinkcijski koeficient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] pri valovni dolžini λ
c - množinska koncentracija [M]
l - dolžina optične poti [cm]

Za DNA uporabljamo svetlobo z valovno dolžino 260 nm.

DOLOČANJE KONCENTRACIJE DNA

Ko izoliramo DNA, želimo, da je le-ta čimbolj čista, a se v vzorcih pogosto nahajajo še druge snovi; precej je lahko proteinov, pa tudi nekaterih drugih molekul, ki motijo merjenje absorbance.

Povsem čista DNA ima absorpcijski vrh pri 260 nm, čisti proteini pa pri 280 nm.

S primerjavo absorbanc pri teh dveh valovnih dolžinah lahko ocenimo, kako čist je vzorec DNA.

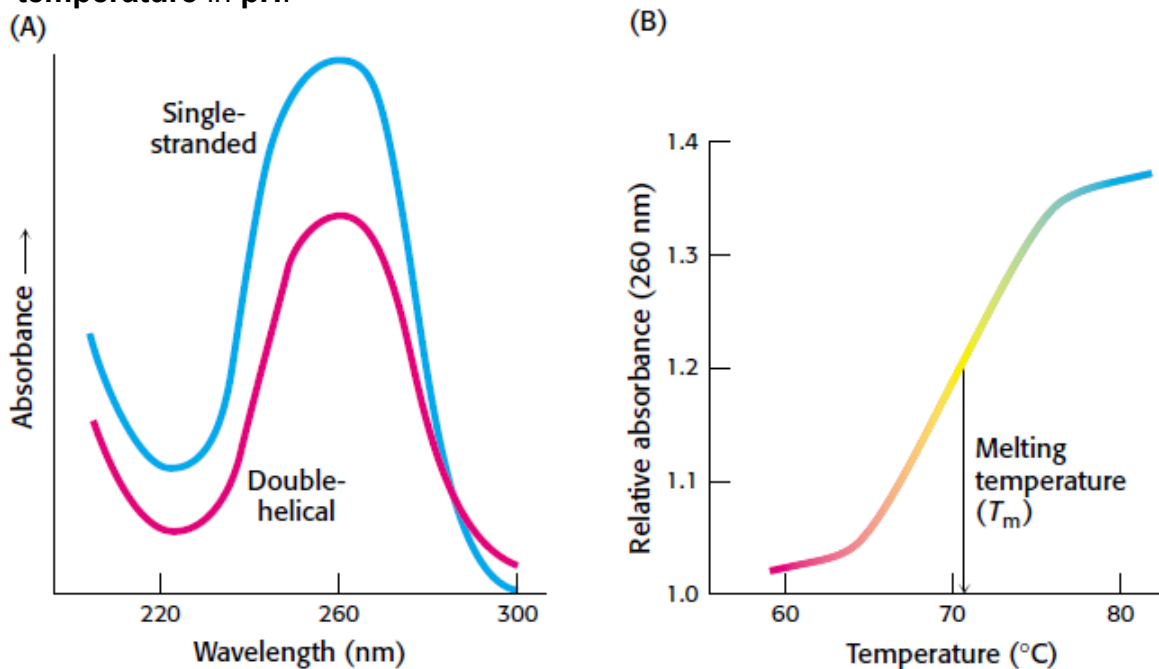
Za idealen primer velja, da je $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$

Spektrofotometrično je mogoče tudi oceniti koncentracijo DNA.

Čista DNA močno absorbira svetlobo v UV območju, tako da velja:
raztopina s koncentracijo 1 mg/ml $\rightarrow A_{260} = 20$.

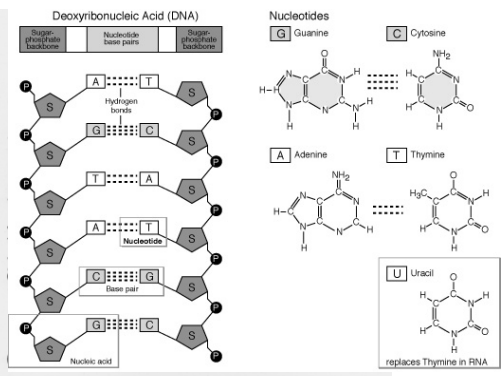
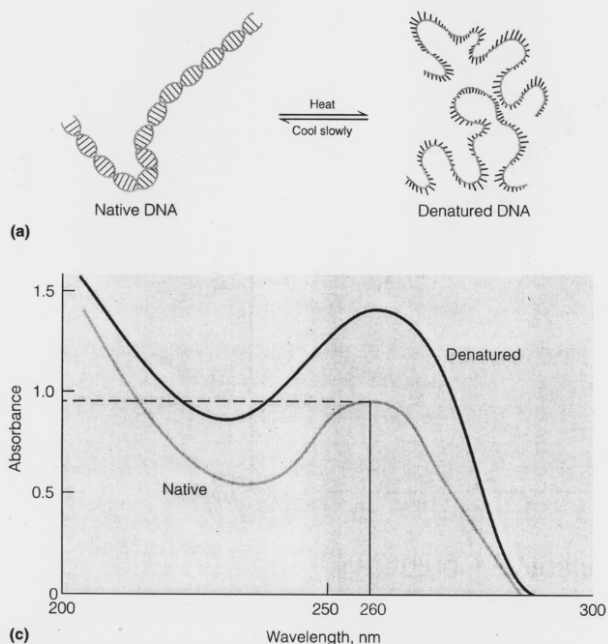
DENATURACIJA DNA

Pod pojem denaturacije DNA imamo v mislih razprtje dvojne vijačnice, torej prekinitev **vodikovih vezi**. Denaturacijo bomo preučevali s spreminjanjem **temperature** in **pH**.



DENATURACIJA DNA - TEMPERATURA

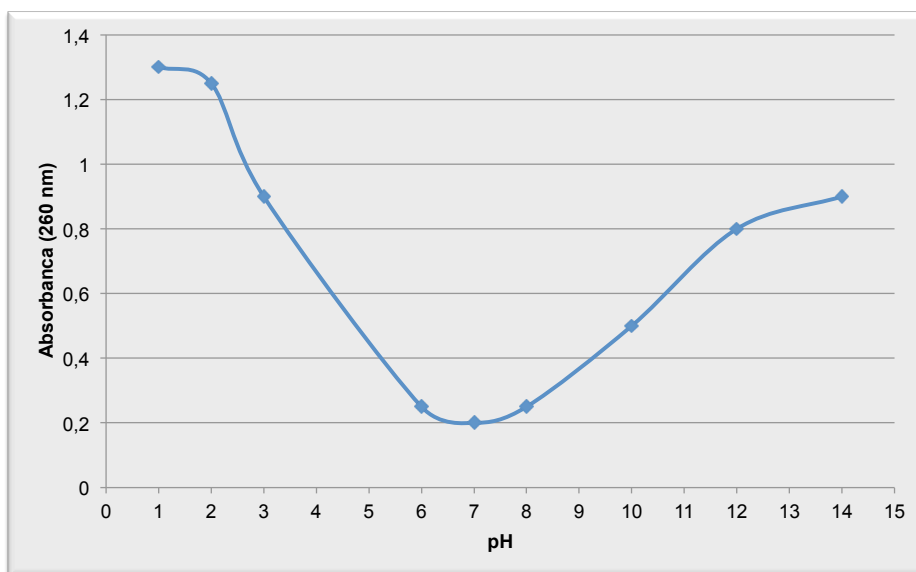
Figure 4.31 Denaturation of DNA



From Mathews and van Holde: *Biochemistry* 2/e. © The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.

DENATURACIJA DNA - pH

Do hiperkromnega efekta pride tudi zaradi vpliva zelo nizkega ali visokega pH na DNA.



Zakaj pride do razlik med kislno in bazično denaturacijo?

DENATURACIJA DNA - pH

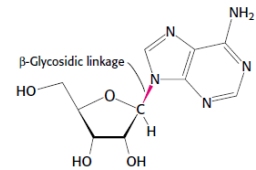
Tako kot pri zvišanju temperature, tudi pri zvišanju pH pride do oslabitve vodikovih vezi in DNA se na posameznih segmentih začne razpirati.

Če se pogoji ne spremenijo, pa se po principu zadrge s teh mest začenja razpad molekule na posamezni verigi.

Pri kislem pH pa poleg zgornjega efekta pride še do **depurinacije DNA**.

Depurinacija je proces, ko zaradi visoke koncentracije H^+ ionov pride do protonacije purinskih baz, ki tako postanejo dobre izstopajoče skupine.

Pride do razpada glikozidne vezi. Glede na to, da se sedaj baze prosto nahajajo v raztopini, je absorbanca še višja.



Depurinacija je spontan in naraven pojav v celicah, kjer za popravo možne škode mehanizme skrbijo popravljalni mehanizmi.