

[Akceptuję](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Metody izolacji białek związanych z DNA i RNA cz.II

W trakcie izolacji DNA, warto zwrócić uwagę także na białka będące ściśle powiązane z tym rodzajem kwasu nukleinowego. Białka wchodzące w skład tzw. deoksyrybonukleoprotein (tj. połączeń białek z DNA) to: protaminy, histony oraz białka niehistonowe. Izolacja tych szczególnych komponentów kwasów nukleinowych, może dostarczyć wielu ciekawych informacji o składzie, czy budowie białek.



Białka związane z DNA

Jako komponent białkowy w deoksyrybonukleoproteinach występują protaminy, histony oraz białka niehistonowe (tj. chromatynowe kwasowe).

Protaminy

Protaminy są definiowane jako białka sprzężone z DNA w komórkach spermy. Stanowią one ostateczny produkt różnorodnych przekształceń komponentu białkowego, towarzyszących spermatogenezie. Spermatogeneza obejmuje serię procesów dojrzewania od komórki, która zawiera histony – z czasem zastępowane przez białka silniej zasadowe tj. białka przejściowe TP (transition proteins), aż do momentu dojrzałego plemnika, w którym występują już tylko dojrzałe protaminy [2], [6].

W chromatynie dojrzałego plemnika dochodzi do sytuacji, kiedy to nukleosomy zastąpione są kompleksami DNA-protaminy. Kompleksy te nie są lub są tylko w minimalnym stopniu superhelikalnie skręcone. Protaminy, w porównaniu z histonami są białkami o połowę mniejszymi, jednakże zawierającymi dwukrotnie większą zawartością reszt argininy (tj. ok. 50–70%) i cysteiny [6].

W pierwszym modelu tego białka z 1982 roku, przedstawionym przez Balhorna, sugerowano, że protaminy układają się wzdłuż wąskiego rowka podwójnej helisy DNA, wiążąc się z rowkiem za pomocą centralnej domeny, z kolei wyeksponowane długie łańcuchy reszt argininy neutralizują ujemny ładunek fosfodiesterowego szkieletu DNA [6].

Dzięki temu, polianionowy DNA ulega przekształceniu w neutralny polimer. Zaś mostki dwusiarczkowe reszt cysteiny dodatkowo wzmacniają stabilność tego skomplikowanego układu [6].

Protaminy są małymi zasadowymi białkami, których masa cząsteczkowa waha się w granicach 4000–12000 Da. Wyróżnia się dwa rodzaje protamin: protamina 1 (P1), która występuje u prawie wszystkich ssaków oraz protamina 2 (P2), obecna u człowieka i u kilku innych gatunków [6].

Protaminy są białkami, które wiążą się wzdłuż fosfodiesterowego szkieletu DNA, dzieje się to niezależnie od sekwencji nukleotydów. Jedna cząsteczka protaminy wiąże się zawsze tylko do jednego skrętu DNA (tj. około 11 pz DNA). Mechanizm, dzięki któremu protaminy uczestniczą w tym procesie, jak dotąd stanowi przedmiot szerokiej dyskusji. A to dlatego, ponieważ stwierdzono, że w warunkach in vitro protaminy mogą wiązać się z DNA w szerszym rowku, zarówno w szerszym jak i węższym rowku, względnie elektrostatycznie do powierzchni DNA [6].

Histony

Są białkami, które dają się ekstrahować w środowisku kwasowym, a także strącać za pomocą zasad. Ponadto, są białkami rozpuszczalnymi w odczynniku Mirsky'ego (tj. 1.88 M H₂SO₄, 0.34 M HgSO₄), nawet w temperaturze 60°C, Kidy to inne białka w takich warunkach ulegają wytrąceniu [2].

Cechą charakterystyczną histonów jest mała masa cząsteczkowa (11 000-21 000). W ich składzie odnotowuje się ok. 18% zawartość azotu. Wśród aminokwasów powszechnie występujących w białkach, w histonach nie występuje tryptofan, i z małymi wyjątkami nie zawierają cysteiny. Wykazują przewagę aminokwasów zasadowych (więcej niż 22%) nad aminokwasami kwasowymi (ok. 15%) [7], [10].

Wszystkie frakcje histonowe zostały podzielone na 3 główne grupy, które różnią się między sobą stosunkiem molowym lizyny do argininy.

W wyniku doświadczeń przeprowadzonych przez Panyima i Chalkleya (1969), otrzymano 5 komponentów odpowiadających głównym frakcjom histonowym tj.: H1, H2A, H2B, H3 i H4 [7], [10].

Od 1969 roku w literaturze pojawiają się prace o sekwencji aminokwasowej poszczególnych histonów grasicy bydłowej oraz innego pochodzenia tych białek. W wyniku przeprowadzonych badań, dziś już wiadomo, że histony są białkami o strukturze I-rzędowej, które doskonale zachowały się w ewolucji molekularnej [2], [7], [10].

Białka niehistonowe chromatynowe - białka NHC (lub białka NHCP- kwasowe chromatynowe) [2].

Białka niehistonowe obok histonów i DNA, stanowią integralny komponent kompleksu deoksyrybonukleoproteiny lub chromatyny. Od klasycznych prac Mirsky'ego i Pollistera (1946) oraz Wanga (1966) w białkach niehistonowych (NHC) można wyróżnić dwie główne grupy. Pierwszą z nich stanowią białka słabo związane z DNA, zaś drugą: białka mocno związane z DNA [2].

Białka słabo związane z DNA mogą zostać oddysocjowane z DNP lub chromatyny w 0.14 M roztworze NaCl. Zaś, białka mocno związane z DNA dzielą się dodatkowo na białko sprzężone z DNA wiązaniami silnymi, ale niekowalencyjnymi, oraz wiązaniami kowalencyjnymi, tj. białka o silnym i bardzo silnym powinowactwie do DNA. Białka o silnym i bardzo silnym powinowactwie do DNA określane są mianem białek niehistonowych resztkowych, które należą do grupy białek najtrudniej ekstrahowanych [2].

Białka niehistonowe stanowią niejednorodne peptydy o masie cząsteczkowej ok. 5000 - 200 000. Białka te zawierają tryptofan równy 0-1% ich masy cząsteczkowej, a dodatkowo znaczny odsetek fosforu tj. ok. 0-1.3% [2].

Metody izolacji DNP i jego komponentów [2].

W metodach izolacji DNA, zarówno z tkanek jak i jąder komórkowych, stosuje się ekstrakcję roztworami o małej sile jonowej, a także stężonymi roztworami soli. Podczas izolacji DNP wyodrębnia się 3 zasadnicze etapy. Pierwszym z nich jest usunięcie RNN, następnie ekstrakcja DNP, a ostatnim etapem jest wytrącenie i oczyszczenie DNP [2].

1. Usunięcie RNP

W etapie tym przeprowadza się ekstrakcję homogenatu tkanki lub izolowanych jąder komórkowych za pomocą soli o małym stężeniu [2].

2. Ekstrakcja DNP

Wśród różnych metod ekstrakcji DNP, godna uwagi jest technika Cramptona i wsp (1954), w której stosuje się wielogodzinną ekstrakcję wodą o temperaturze 0°C. Wśród metod opartych na ekstrakcji DNP stężonymi roztworami soli najbardziej powszechną metodą jest metoda wg Mirsky'ego i Pollistera (1942), atakże jej modyfikacje. W metodach tych stosuje się ekstrakcję pozostałości tkankowej po usunięciu RNP za pomocą 1-2 M roztworu NaCl. Z kolei, w technice Hursta (1958) stosuje się homogenizację tkanki (1-2 minuty) wolnej od białek RNP w mieszaninie różnych objętości roztworów 2 M NaCl i 0.01 M EDTA. Nukleoproteiny nasienia niektórych zwierząt nie są rozpuszczalne ani w wodzie ani w 1 M roztworze NaCl, w związku z czym wymagają bardziej stężonych roztworów NaCl, a dodatkowo przeprowadzenia hydrolizy zasadowej [2].

3. Wydzielanie DNP z roztworów

W celu wytrącenia DNP z wodnych ekstraktów stosuje się dodanie do nich NaCl do stężenia 0.05 M, lub CaCl₂. Używając CaCl₂ w konsekwencji otrzymuje się osad DNP, który jest trudny do rozpuszczenia. Stosując 1-2 M roztwory NaCl DNP wytrąca się głównie przez rozcieńczenie wodą do końcowego stężenia równego 0.14 M NaCl (Mirsky i Pollister 1942). Ewentualnie można zastosować etanol, tak jak w metodzie Gullanda i wsp. (1947). Oczyszczenie DNP przeprowadza się stosując kilkakrotne rozpuszczenie DNP i ponowne jego wytrącenie z rozpuszczalnika [2].

Izolowanie białek histonowych (histonów) [2].

Zastosowanie różnych metod izolacji kwasów nukleinowych powoduje utratę niewielkich ilości białek histonowych. Mirsky i Ris w swoich badaniach donieśli, że białka histonowe stanowią ponad 80% białek zlokalizowanych w chromosomach grasicy [5].

Metody stosowane do izolacji białek histonowych można podzielić na 2 grupy tj.: ekstrakcja soli histonowych przez poddanie materiału badanego (DNP, jąder komórkowych lub tkanki) działaniu rozcieńczonych mocnych kwasów, oraz na metody, w których zachodzi dysocjacja DNP w roztworach soli obojętnych [2].

Metody, w których stosuje się ekstrakcje soli histonowych mają wiele odmian. W trakcie ich stosowania używa się np. rozcieńczonych roztworów HCl lub H₂SO₄, lub kwasu cytrynowego, bądź 1,88 M roztwór H₂SO₄ zawierający 0,34 M HgSO₄, 1 M roztwór NaCl o pH=2.9. Chlorek histonu lub siarczan może być wydzielony z kwasowego ekstraktu siarczanem amonu, działaniem amoniaku, można również strącić go izoelektrycznie z pomocą roztworów NaOH, lub działając na roztwór siarczanu histonu Ba(OH)₂. Najczęściej jednak efekt otrzymuje się zakwaszonym acetonem lub stosując liofilizację dializowanego materiału.

Wśród metod wykorzystujących dysocjację DNP w roztworach soli obojętnych, najczęściej stosuje się metodę Butlera i wsp. (1954), która opiera się na dysocjacji nukleohistonu w 10% roztworze NaCl o pH=7.0. Następnie wytrąca się DNA w obecności 30% stężenia acetonu lub etanolu, dalej przeprowadza się wysolenie histonu z pozostałego roztworu stosując w tym celu siarczan amonu, otrzymany strątek rozpuszcza się, a na końcu przeprowadza się liofilizację po dializie roztworu histonu [2].

Izolowanie białek niehistonowych [2].

Białka niehistonowe DNP (lub chromatyny) charakteryzują się bardzo trudną rozpuszczalnością w powszechnie używanych rozpuszczalnikach, stosowanych w chemii białek. Ta specyficzna właściwość białek niehistonowych przez wiele lat stwarzała problemy z wyizolowaniem i dokładnym zbadaniem właśnie tej grupy białek. Przełom nastąpił w latach 60. i 70., kiedy to opracowano dwa

generalne schematy postępowania z tymi białkami, zastępując tym samym drastyczne metody zasadowej ekstrakcji białek niehistonowych [2].

W pierwszej metodzie białka niehistonowe oddziela się od DNA za pomocą zbuforowanych roztworów fenolu (pH=8.4), bądź stosując ultrawierowanie. Materiałem wyjściowym jest odhistonowane DNP (lub chromatyna), lub jądra komórkowe, które pozbawione są RNP, lipidów i histonów [2].

Druga metoda opiera się na dysocjacji DNP (lub chromatyny) najczęściej w układzie 2 M NaCl- 5 M mocznik (lub 2.5 M chlorek guanidyny). Następnie usuwa się DNA przez ultrawierowanie lub strącanie, po czym oddziela się białka niehistonowe od histonów. Zazwyczaj w tym celu stosuje się metody chromatografii jonowymiennej [2].

Otrzymywanie białek NHC o słabym powinowactwie do DNA [2].

W metodzie tej preparat DNP lub chromatyny poddaje się dysocjacji w 1 M roztworze NaCl. Pod wpływem 6-8 godzinnej dializy tego roztworu (wobec 6 objętości wody, a więc w środowisku 0,14 M NaCl) dochodzi do wytrącenia kompleksu DNA-histon- białko NHC mocno związane z DNA, w roztworze zaś zostaje białko NHC słabo związane z DNA. Białko to daje się wydzielić z dializatu za pomocą $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (nasycenie 70-80%) [2].

Metoda izolacji deoksyrybonukleoprotein z grasicy bydlęcej [1].

1.Ekstrakcja DNP

Osad homogenatu grasicy bydlęcej po ekstrakcji białek RNP, potraktować 3 objętościami 1 M roztworu NaCl. Wymieszać szklaną bagietką i odwirować (5000 x g, 15 minut). Zabieg ten powtórzyć 2 razy. Otrzymywany po wirowaniu supernatant zlewać do cylindra miarowego- wcześniej oziębionego, i przechowywać w lodówce. Po skończeniu ekstrakcji należy oznaczyć objętość połączonych supernatantów DNP, a następnie przelać je do zlewki z dokładnie odmierzoną 6-krotną objętością (w stosunku do objętości roztworu DNP) oziębionej H_2O . Niewielką jej ilością przepłukać cylinder [1]. Zawartość zlewki delikatnie wymieszać, nawijając na bagietkę włókna wytrąconego DNP. Włókna DNP nawinięte na bagietkę zsunąć do małej zlewki, zaś włókna DNP które pozostały w roztworze zebrać przez odwirowanie próbki (ok. 1000 x g, 5 minut). Otrzymany strąć DNP rozpuścić w niewielkiej ilości 1 M roztworu NaCl (pH= ok. 7) [1].

2.Otrzymanie preparatu DNP [1].

Rozpuszczony w 1 M roztworze NaCl strąć DNP należy odwirować (5000 x g, 15 minut). Otrzymany supernatant zmierzyć objętościowo w cylindrze miarowym. Około $\frac{1}{4}$ roztworu DNP należy przeznaczyć na otrzymanie suchego preparatu. W tym celu, należy wytrącić DNP przez 6-krotne rozcieńczenie w wodzie , otrzymany po wirowaniu strąć osuszyć etanolem (96%), eterem i ciepłym powietrzem (np. z suszarki fryzjerskiej). Pozostałe $\frac{3}{4}$ roztworu DNP w 1 M roztworze NaCl (pH= ok. 7) przeznaczyć do izolowania białka NHC histonu [1].

Metoda izolacji białka NHC o słabym powinowactwie do DNA z deoksyrybonukleoprotein grasicy bydlęcej [3].

Jako materiał do izolacji białka NHC należy wykorzystać ekstrakt deoksyrybonukleoprotein grasicy bydlęcej w 1 M roztworze NaCl (pH= ok. 7) [3].

1.Otrzymanie białka NHC o słabym powinowactwie do DNA

Znaną objętość roztworu DNP (w 1 M roztworze NaCl) należy przenieść (za pomocą lejka szklanego przepłukanego 1 M NaCl) do worka dializacyjnego (wcześniej dobrze wymytego w wodzie i przepłukanego 2 razy w 1 M roztworze NaCl). Zawiązany worek z roztworem DNP umieścić w zlewce napełnionej 6 objętościami lodowatej wody w stosunku do objętości roztworu DNP. Dializę należy prowadzić na mieszadle magnetycznym przez okres ok. 12 godzin. Momentem świadczącym o końcu dializy jest pojawienie się strątu pozostałości DNP (tj. DNP + pozostałość NHCP). Po tym czasie, zawartość worka dializacyjnego odwirować (przy ok. 1000 x g, przez 10 minut). Powstały po wirowaniu supernatant przenieść ilościowo do cylindra miarowego o obj. 50 ml. Do określonej objętości roztworu białkowego wprowadzić taką odważkę $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w stanie stałym), aby uzyskać 80% nasycenia. Wytrącone w ten sposób białko NHC odwirować , następnie dializować wobec kilkakrotnie zmienianej zimnej wody, aż do braku reakcji na siarczany. Dializat potraktować zimnym acetonem, zaś osad przemyć 3-krotnie zimnym acetonem, a na koniec osad osuszyć ciepłym powietrzem [3].

Izolowanie histonu z pozostałości DNP po oddializowaniu białek NHC. Otrzymanie pozostałości DNP pozbawionej białek NHC oraz histonów. Analiza histonu całkowitego [2].

Jako materiał do izolacji należy wykorzystać DNP po oddializowaniu białek NHC o słabym powinowactwie do DNA [2].

1.Ekstrakcja histonu całkowitego

Strąt DNH + pozostałość NHCP przemyć za pomocą 0.14 M roztworu NaCl. Strąt rozbić dokładnie w niewielkiej ilości supernatantu za pomocą szklanej bagietki, po czym dodawać do niego kroplami 0,2 M roztwór HCl, starannie mieszając. Do probówki wirówkowej wprowadzić 2 objętości 0,2 M roztworu HCl (w stosunku do objętości wyjściowego osadu). Następnie ekstrahować histon całkowity w ciągu 20 minut za pomocą dokładnego rozcierania zawartości probówki bagietką. Po roztarciu, próbkę odwirować (2000 x g, 10 minut), ekstrakcję histonu powtórzyć jeszcze 2 razy, za każdym razem zbierając supernatant w oddzielnej probówce wirówkowej. Ekstrakt histonu w probówkach wirówkowych lub w zlewkach, potraktować 10 objętościami oziębionego acetonu, całość próbki dobrze zamieszać. Wytrącony strąt histonu przemyć 2 razy niewielką ilością acetonu, po czym wysuszyć w eksykatorze próżniowym [2].

2.Otrzymanie pozostałości DNP po wyekstrahowaniu białek NHC oraz histonów [2].

Otrzymany osad DNP, który pozbawiony jest zarówno białek NHC jak i histonów, należy osuszyć- wykorzystując w tym celu etanol, następnie eter i na końcu ciepłe powietrze (np. z suszarki) [2].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

- [1]. Nucleoproteins of cell nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 28:344-352 Mirsky A.E., Pollister A.W., 1942.
- [2]. Kłyszewko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 332-358
- [3]. Wang T.Y., 1967. The isolation , properties, and possible functions of chromatin acidic proteins. J. Biol. Chem., 242: 1220-1226.
- [4]. Brown T.A, 2001. Białka wiążące DNA, rozdział 7, s. 163-165. Wydawnictwo Naukowe PWN.

[5]. Pollister A.W., Leuchtenberger C., 1948. The Nucleoprotein Content Of Whole Nuclei DEPARTMENT OF ZOOLOGY, COLUMBIA UNIVERSITY Communicated by L. C. Dunn, December 3, 1948

VOL. 35, 1949 ZOOLOGY.

[6]. Wiland E., Żegała M., Kurpisz M, 2006. Topologia chromosomów w jądrze komórkowym. Plemniki. Część 2. Postępy Hig Med Dosw. (online), 2006; 60: 343-351

[7]. Mariño-Ramirez L., Kann M.G., Shoemaker B.A., Landsman D., 2005. Histone structure and nucleosome stability. Expert Rev. Proteomics 2 (5), 719-729 (2005).

[8]. Tamás Kiss, 2004. Biogenesis of small nuclear RNPs. Journal of Cell Science 117 (25), 5949-5951 Published by The Company of Biologists 2004

[9]. Żegała M, Wiland E, Kurpisz M, 2006. Topologia chromosomów w jądrze komórkowym. Diploidalna komórka somatyczna. Część 1. Postępy Hig Med Dosw. (online), 2006; 60: 331-342.

[10]. <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Histony/>

<http://laboratoria.net/arttykul/12500.html>

Informacje dnia: [2 edycja Targów LABS EXPO za nami! Dbasz o serce? Zadbaj o psychikę! Muszę o siebie dbać, żeby się nie wypalić jako wolontariusz Walczymy z osamotnieniem chorych na raka dróg żółciowych Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Kwasy humusowe z odzysku 2 edycja Targów LABS EXPO za nami! Dbasz o serce? Zadbaj o psychikę! Muszę o siebie dbać, żeby się nie wypalić jako wolontariusz Walczymy z osamotnieniem chorych na raka dróg żółciowych Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Kwasy humusowe z odzysku 2 edycja Targów LABS EXPO za nami! Dbasz o serce? Zadbaj o psychikę! Muszę o siebie dbać, żeby się nie wypalić jako wolontariusz Walczymy z osamotnieniem chorych na raka dróg żółciowych Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Kwasy humusowe z odzysku](#)

Partnerzy