

[Akceptuje](#)

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](#) [Szkozenia](#) [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.I

Wśród metod izolacji kwasów nukleinowych bardzo często można spotkać także metody, w których izoluje się charakterystyczne dla kwasów nukleinowych białka tj. rybo nukleoproteiny i deoksyrybonukleoproteiny. Obecnie znanych jest wiele różnych metod izolacji tych białek, jednak najlepsze z nich opierają się na badaniach Mirsky'ego (1971), uważanego za pionierskiego badacza w dziedzinie nukleoprotein. Pierwsze wiadomości odnośnie białek związanych z RNA datuje się od doniesień Cramptona (1959).

Dzięki szeroko przeprowadzonym badaniom, dziś już znane są główne funkcje białek związanych z kwasami nukleinowymi.



Słowa kluczowe: nukleoproteiny (NP), rybonukleoproteiny (RNP), deoksyrybonukleoproteiny (DNP), białka NHC (NHCP), białka reszkowe DNP, histony, białka rybosomowe, protaminy, białka niehistonowe.

Białka wiążące DNA pełnią wiele ważnych funkcji w organizmie. Biorą udział w procesie ekspresji genomu, a dodatkowo spełniają funkcje strukturalne w chromosomach prokariotycznych i eukariotycznych, a także w procesie replikacji naprawy DNA. Duże znaczenie mają też białka wiążące się z RNA [4].

Aby specyficznie wiązać się z podwójną helisą, białko musi wejść z nią w kontakt, dzięki czemu umożliwiające będzie poznanie przez niego sekwencji kwasu nukleinowego. W większości przypadków, działanie takie umożliwiające jest dzięki penetracji większego lub mniejszego rowka DNA- tak by możliwy był bezpośredni odczyt sekwencji. Zazwyczaj towarzyszą temu mniej specyficzne oddziaływania z powierzchnią cząsteczki DNA. Przeważnie wpływają one na stabilizację kompleksu białko-DNA [4].

Nukleoproteiny (NP) określane są jako trójwymiarowe połączenia dwójakiego rodzaju wielkocząsteczkowych amfolitów. Tak więc połączenia te obejmują kwas nukleinowy (DNA lub RNA) i białka, które sprzężone są ze sobą za pomocą bardziej- lub mniej trwałych wiązań. Charakter komponentu nukleinowego tj. DNA lub RNA, które uważane są za grupę prostetyczną nukleoprotein, determinuje istnienie w materiale biologicznym dwóch rodzajów białek tj. rybonukleoprotein (RNP) oraz deoksyrybonukleoprotein (DNP) [2].

Badania nad nukleoproteidami datuje się od 189 roku. Wtedy to Miescher otrzymał z leukocytów złożoną substancję, która bogata była w fosfor i azot. Tak więc substancja ta nazwana została nukleiną, dla podkreślenia jej jądrowego pochodzenia. Analogiczne substancje zostały także wyizolowane z tkanek charakteryzujących się dużymi jądrami komórkowymi, tak więc wśród nich znalazły się plemniki łososia, ptasie erytrocyty czy grasica. W toku licznych badań Miescher zasugerował, że nukleina pochodząca z nasienia łososia jest solą jakiegoś kwasu (bogatego w fosfor) z organiczną zasadą azotową. Sól ta została nazwana przez Miescher'a protaminą.

Z kolei, Altmann (1889) zaproponował termin „kwas nukleinowy” jako nazwa dla kwasu związanego z solą, dzięki czemu zróżnicowano kwas nukleinowy wyizolowany przez Altmann'a z komórek drożdży (tj. kwas nukleinowy drożdżowy- „roślinny”), od kwasu nukleinowego grasicowego („zwierzęcego”). Nazwy te przez wiele lat były błędnie używane dla określania kwasu rybonukleinowego (RNA) i deoksyrybonukleinowego (DNA), występujących zarówno w komórkach roślinnych jak i zwierzęcych [2].

W 1884 roku Kossel wyizolował z jąder komórkowych erytrocytów ptasich inne białko zasadowe, które nazwał histonem. Kossel także udowodnił białkowy charakter protaminy. Protaminy i histony przez długi czas uważane były za jedyne białka DNP. W 1914 roku Steudel, obserwując mniejsza

zawartość histonów w porównaniu z całkowitą ilością białka w DNP zasugerował, że istnieje jeszcze inny komponent białkowy, który jest sprzężony z DNA. I tak od lat 40. W literaturze pojawiło się dużo różnych określeń tego składnika [2].

Aktualnie w terminologii naukowej, pozostałości jąder komórkowych po wyekstrahowaniu RNP i DNP określa się jako białka resztkowe jąder komórkowych lub białko kwasowe pozachromatynowe. Z kolei białka kwasowe DNP lub chromatyny określa się jako białka kwasowe chromatyny albo białka niehistonowe chromatyny (tj. białka NHC lub NHCP) [2].

Pomimo, iż DNP ekstrahuje się z jąder komórkowych od końca XIX wieku, to dopiero w 1961 roku Bonner i wsp. zaczęli utożsamiać ekstrakt DNP z chromatyną [2].

Z kolei, pierwsze wiadomości na temat białek związanych z RNA datuje się od doniesień Cramptona (1959) i Petermana (1959), dotyczących składu aminokwasowego białek zasadowych, które to otrzymano ekstrahując cytoplazmatyczne cząstki rybonukleoproteinowe wątroby szczura rozcieńczonymi kwasami [2].

Białka związane z RNA

Białka związane z RNA to przede wszystkim białka rybosomowe, a to ze względu na dużą ilość rybosomów w komórce eukariotycznej. Rybosomy często stanowią nawet ok. 50% objętości komórki. Rybosomy cytoplazmatyczne charakteryzują się stosunkiem wagowym białko/RNA równym 1:1.

Białka RNP ekstrahuje się zazwyczaj stosując stężone roztwory mocznika, 66% roztwór CH₃COOH lub rozcieńczony kwas solny (HCl). Ponadto, stosuje się także trawienie rybosomów RNazą w 0.1 M buforze Tris/HCl. Masy cząsteczkowe tych białek wahają się w granicach 10 – 50 kDa. W składzie białek wyróżnia się ok. 18-23 mol% zawartości aminokwasów zasadowych, ze stosunkiem Lys/Arg bliskim 1.2, a także suma aminokwasów kwasowych (tj. 17-20 ml %) [2].

Rybonukleoproteiny występują w komórce zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. Rybonukleoproteiny można podzielić na:

- 1) jądrowe RNP, a wśród nich wyróżnia się rybo nukleoproteiny jąderkowe i pozająderkowe oraz
- 2) cytoplazmatyczne RNP, a wśród nich: rybo nukleoproteiny rybosomowe i pozarybosomowe, a także RNP mitochondriów i RNP chloroplastów (u roślin) [2], [8].

Pod względem wielkości RNP można sklasyfikować jako: RNP wysoko- i niskocząsteczkowe.

Wysokocząsteczkowe RNP stanowią głównie preribosomowe RNP (pre-rRNP), rybosomowe RNP (rRNP), pre-mRNP inaczej określane hnRNP (niejednorodne jądrowe RNP) [2], [8].

Niskocząsteczkowe RNP to z kolei: małe RNP (sRNP- small RNP), wśród których wyróżnia się: rRNP tj. rybo nukleoproteiny zawierające małe rybosomowe RNA, snRNP tj. małe jądrowe RNP, małe jąderkowe RNP (tj. snoRNP) oraz małe cytoplazmatyczne RNP (scRNP-small cytoplazmie RNP), które utworzone są z udziałem scRNP [2], [8].

Małe jądrowe rybonukleoproteiny stanowią grupę białek ściśle związanych ze składaniem i dojrzewaniem cząsteczek RNA i są umiejscowione w miejscach aktywnej transkrypcji [9].

Podczas izolacji białek związanych zarówno z DNA jak i z RNA tj. RNP i DNP, wszystkie zabiegi przeprowadza się w niskiej temperaturze. Tak więc homogenizacja, ekstrakcja i wirowanie odbywają się w temperaturze od 0°C do 4°C, najczęściej więc zabiegi te przeprowadza się w chłodni, lodówce lub w pojemniku z rozdrobnionym lodem. Używane w trakcie izolacji narzędzia i naczynia także są wcześniej chłodzone. Działania takie są niezbędne ze względu na dużą podatność zarówno

komponentu nukleinowego jak i białkowego na degradację termiczną i enzymatyczną (zwłaszcza pod wpływem proteinazy chromatynowej. Niska temperatura zmniejsza aktywność wielu enzymów [2].

Ekstrakcja RNP [2].

Metody izolowania RNP za pomocą rozcieńczonych zasad (np. 3% NaOH, 0.75 M NaOH), czy wodą z dodatkiem NaHCO₃, bądź lekko zasadowymi roztworami buforowymi (np. bufor boranowy o pH=8.4), aktualnie wyszły już z użycia, ze względu na możliwość jednoczesnej ekstrakcji DNP degradację nukleoprotein [2].

Obecnie stosowane metody można podzielić na dwie kategorie:

- 1) ekstrakcja RNP izotonicznymi roztworami soli
- 2) frakcjonowane wirowanie homogenatów komórkowych.

Ekstrakcja RNP izotonicznymi roztworami soli [2].

Metody ekstrakcji z zastosowaniem izotonicznych roztworów soli cechują się pewną selektywnością. Wykorzystują one rozpuszczalność nukleoprotein w różnych stężeniach NaCl, a przede wszystkim nierozpuszczalność DNP w 0.14 M NaCl przy braku zmian rozpuszczalności RNP zależnie od stężenia NaCl. Najczęściej w metodach tych stosowany jest 0.14 M roztwór NaCl (o pH= 7). W przypadku gdy z jednej porcji tkanki chce się otrzymać zarówno RNP jak i DNP, wtedy do roztworów ekstrahujących dodaje się inhibitorów DNazy. Wśród tych inhibitorów stosuje się np. cytrynian sodu w stężeniu 0.01- 0.05 M, NaF 0.1 M czy 0.1 M roztwór EDTA. Tkanki, które są szczególnie bogate w RNP np. wątroba, trzustka czy nerki, wymagają wielokrotnej 20-30 minutowej ekstrakcji, aż do momentu braku strątu białkowego z 5% roztworem CCl₃COOH, ewentualnie do ujemnej reakcji na tryptofan w wyciągu, podczas gdy dla materiału o dużej wartości stosunku jądro- cytoplazmatycznego wystarczy 2-krotne przemycie odpowiednim roztworem [2].

Otrzymywanie białek RNP metodą frakcjonowanego wirowania [2].

Zastosowanie tej techniki pozwala na uzyskanie czystej frakcji rybosomów cytoplazmatycznych lub rybosomów jądrowych [2].

Homogenat komórek lub jąder komórkowych zawieszonych w roztworze 0.25 M sacharozy lub w 0.05-0.1 M buforze Tris/HCl (o pH= 7) poddaje się wirowaniu przy 20 000 - 30 000 x g przez 30 minut. Ma to na celu oddzielenie cięższych cząsteczek. Następnie, poddanie otrzymanego supernatantu ultrawirowaniu przy 78 000 x g (3 godziny), 105 000 x g (1,5 godziny) bądź 150 000 x g przez 1 godzinę, dostarcza osadu rybosomowego, który z kolei stanowi główną masę rybonukleoprotein komórkowych [2].

Wydzielenie RNP z roztworów soli [2].

Z roztworów soli rybo nukleoproteiny strąca się poprzez dodanie kwasu. Najczęściej jest nim CH₃COOH lub HCl do pH= 4-5. Można także zastosować oziębiony 96% roztwór etanolu (tj. 1-2 objętości). Ważne jest by możliwie jak najszybciej oddzielić strąty RNP od supernatantu, w celu uniknięcia rozkładu nukleoprotein w środowisku kwasowym lub alkoholowym. W przypadku gdy uzyskany preparat RNP ma być poddany analizie chemicznej, otrzymany strąty RNP przemywa się etanolem, następnie mieszaniną etanolu i eteru, a na końcu eterem, po czym suszy się go w próżni nad stężonym roztworem H₂SO₄ lub bezwodnym CaCl₂ [2].

Izolowanie RNA i białka z preparatów RNP [2].

W celu przeprowadzenia ekstrakcji RNA lub białek używa się świeżo uzyskanych i nieodwadnianych

stratów RNP lub frakcji rybosomowej [2].

Izolowanie rybonukleoprotein z grasicy lub trzustki bydłej [1], [2].

Grasica lub trzustka powinny być jak najszybciej zamrożone w termosie z lodem po pobraniu z organizmu zwierzęcia i przechowywane w takim stanie do momentu rozpoczęcia preparatyki [1].

1. Ekstrakcja RNP [1], [2].

Świeżą tkankę grasicy (ok. 15 g) bardzo dokładnie oczyszczoną z tłuszczu oraz błon łącznotkankowych a także przemytą roztworem SSC (tj. sodium chloride + sodium citrate: 0.14 M roztwór NaCl w 0.014 M roztworze cytrynianu sodu, pH= ok.7), pociąć na drobne kawałki, używając w tym celu nożyczek. Następnie próbkę homogenizować z dwoma objętościami SSC przez 30 sekund. Homogenat przenieść do probówek wirówkowych, umieszczonych w łaźni lodowej, a następnie mieszać szklaną bagietką przez 20 minut. Odwirować (ok. 1000 x g, 10 minut) [1], [2].

Otrzymany supernatant ostrożnie zlać jednym ruchem do małej zlewki: do 1 ml supernatantu dodać 1 ml 20% roztworu CCl₃COOH, po czym obserwować pojawienie się strątu świadczącego o obecności RNP [1], [2].

Ekstrakcję RNP (wg opisanej metody) przeprowadzić 2-3 razy, aż do momentu gdy w supernatancie nie będzie widoczny strąć z roztworem CCl₃COOH (20%). Następnie, z połączonych supernatantów (złanych do erlenmeyerki umieszczonej w lodzie) strącić RNP przez zakwaszenie roztworu za pomocą HCl do pH= 4-5. Po upływie ok. 30 minut otrzymany strąć odwirować przy ok. 15 000 x g przez 10 minut, a dalej rozpuścić w roztworze SSC [1], [2].

2. Otrzymanie preparatu RNP [1], [2].

Rozpuszczony w roztworze SSC RNP należy odwirować (ok. 1500 x g, 10 minut). Otrzymany supernatant przenieść do nowej probówki wirówkowej i dodać 2 objętości oziębionego 96% etanolu. Odstawić do lodówki na ok. 30 minut. Po tym czasie strąć RNP odwirować (1000 x g, 5 minut), przemyć 96% roztworem etanolu i mieszaniną etanol-eter (w stosunku 3:1), a na koniec eterem, za każdym razem odwirowując (1000 x g, 5 minut). Osad suszyć w strumieniu ciepłego powietrza (np. za pomocą suszarki fryzjerskiej) [1], [2].

Ze względu na dużą labilność nukleoprotein (nawet w temperaturze pokojowej), wszystkie etapy izolacji należy przeprowadzać w pojemnikach umieszczonych na lodzie, a także stosując ochłodzone narzędzia. Probówki, w których odwirowuje się próbki powinny być także ochłodzone [1], [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]. Kłyszajko-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/>

<https://laboratoria.net/arttykul/12457.html>

Informacje dnia: [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#) [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#) [Ruszyła IV edycja konkursu Pomosty Przyszłości Kleszcz to tylko pośrednik Jak rower zmienił świat Polacy opracowują aparaturę dla teleskopów europejskiej misji kosmicznej](#) [Badanie: portale społecznościowe nie chronią przed samotnością Norowirusy - biegunka brudnych rąk](#)

Partnerzy