

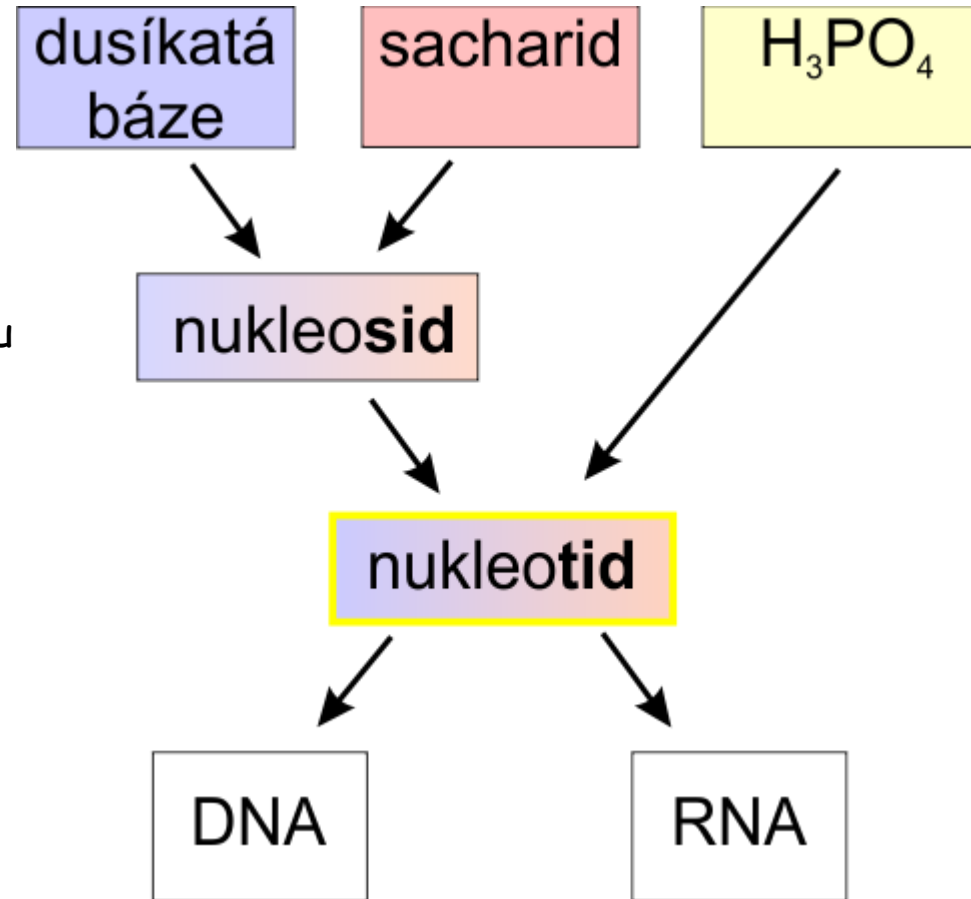
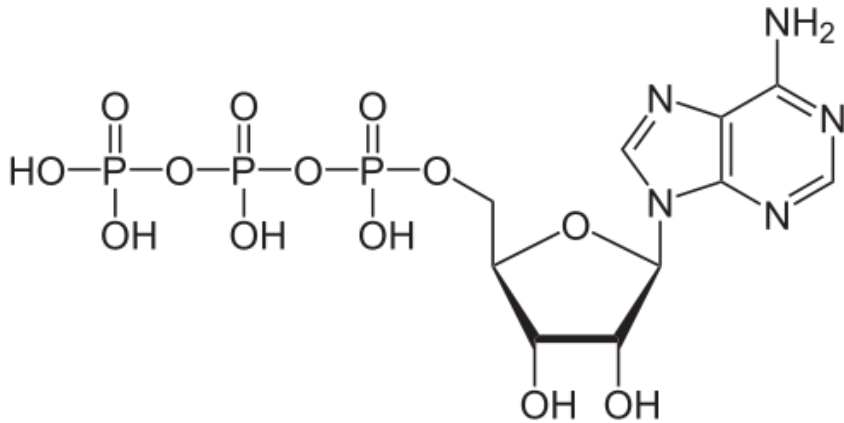
Nukleové kyseliny

Složení

Dusíkatá báze - deriváty purinu a pyrimidinu

Sacharid - ribosa, deoxyribosa

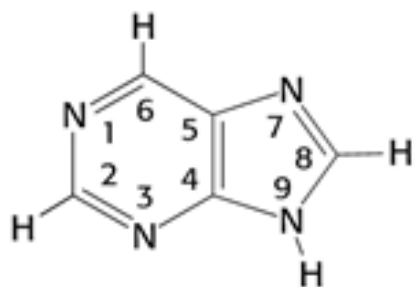
H_3PO_4



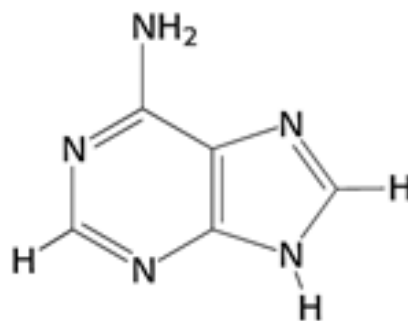
Dusíkatá báze

deriváty purinu a pyrimidinu

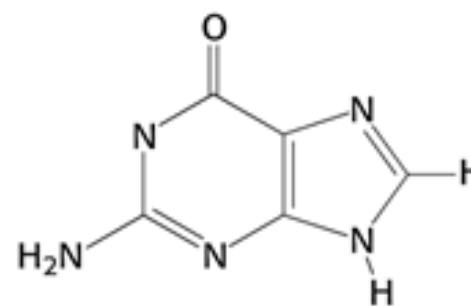
v molekule NK se vyskytují čtyři - dvě báze „pyrimidinové“ a dvě „purinové“
DNA (adenin, guanin, cytosin, **tymin**) RNA (adenin, guanin, cytosin, **uracil**)



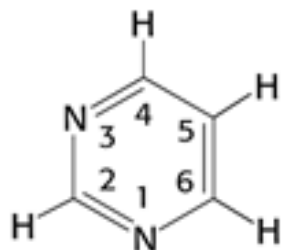
Purine



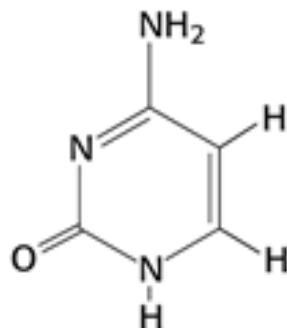
Adenine



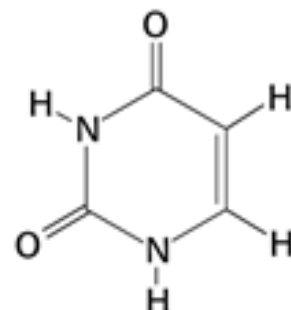
Guanine



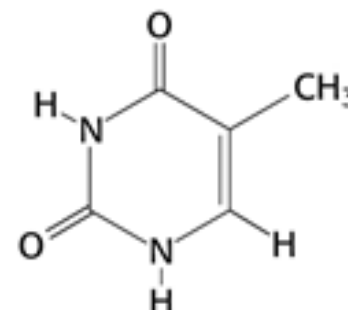
Pyrimidine



Cytosine

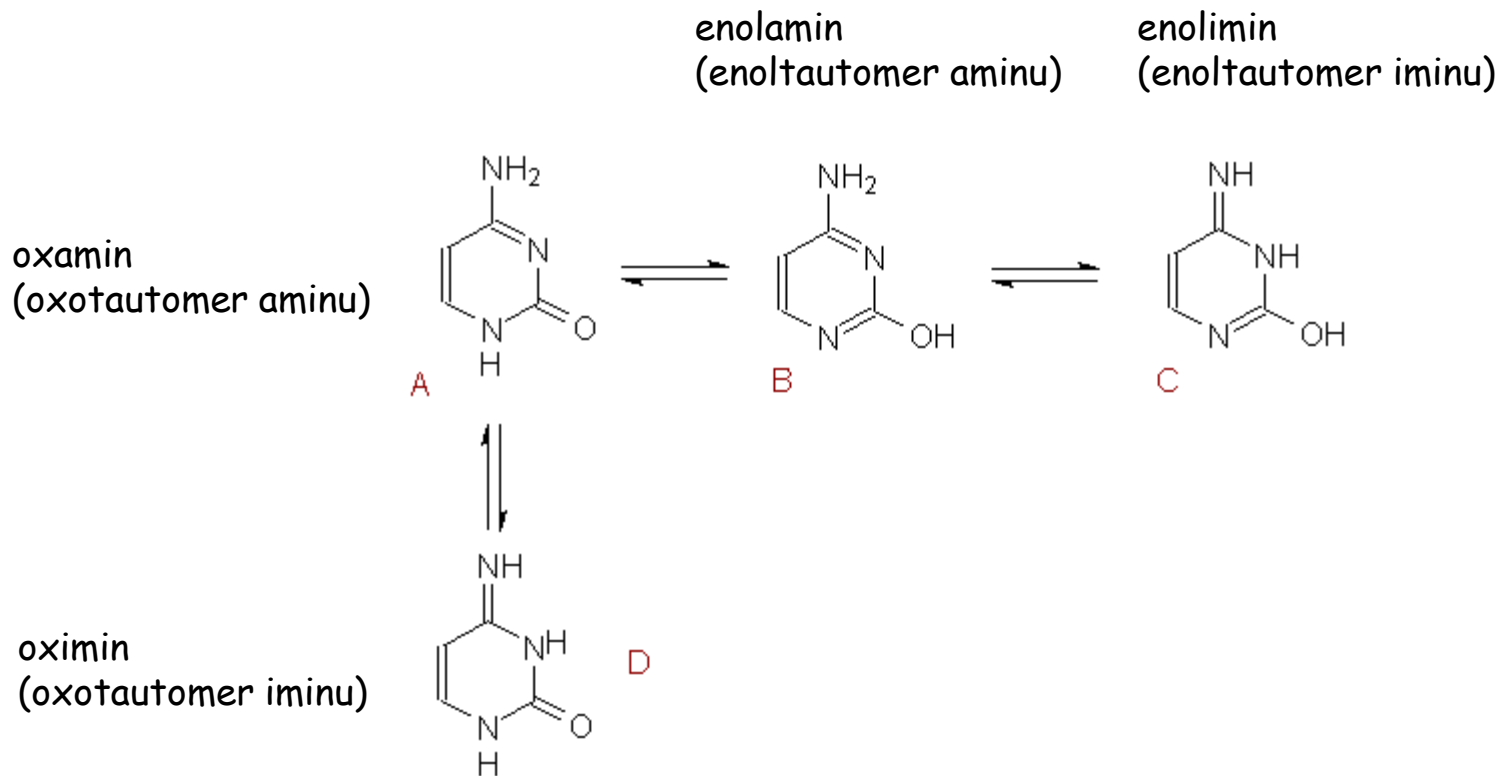


Uracil



Thymine

tautomerní formy cytosinu



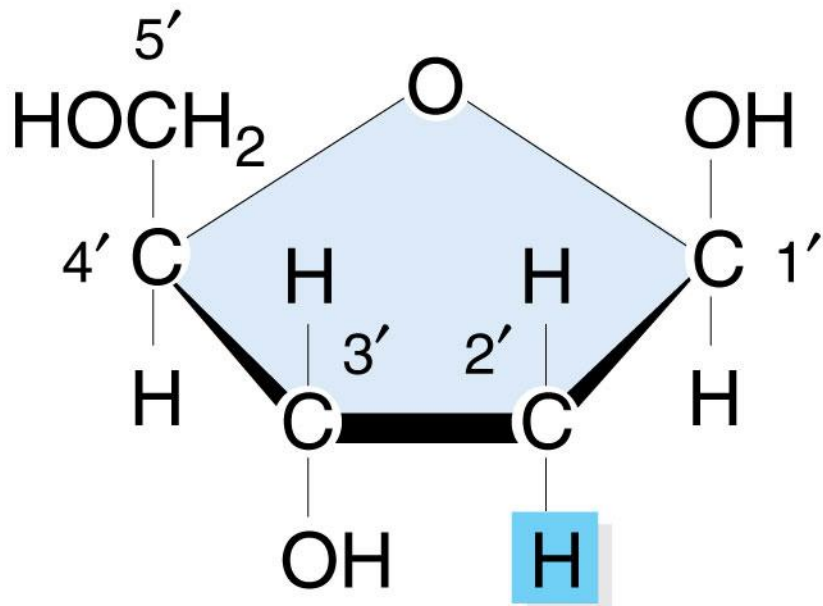
V těchto případech je oxoforma stabilnější než enolforma (99,9% směsi)
amínová forma stabilnější než imínová (97% směsi)

Kyslíkaté deriváty pyrimidinu a purinu existují (za fyziologických podmínek) převážně v **oxoformě** a **dusíkaté** v **aminoformě**

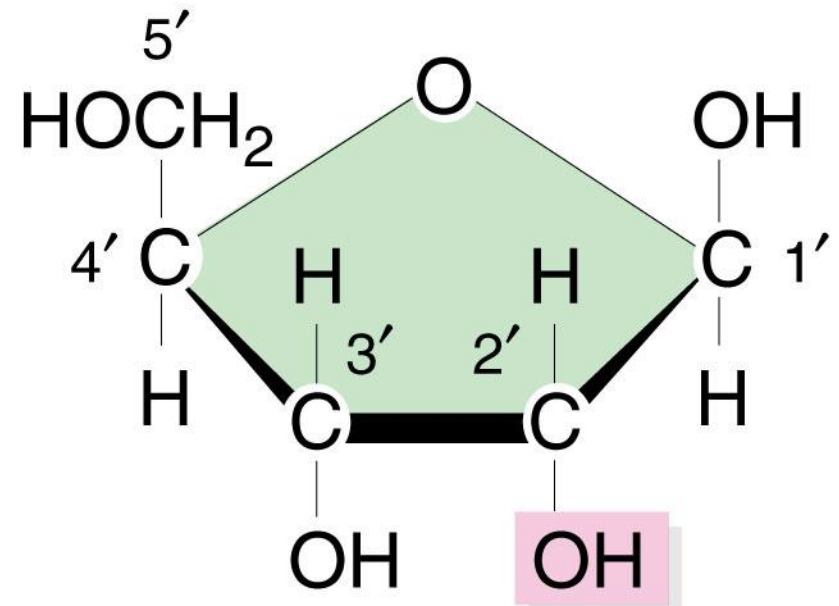
Sacharid

pentozy - **ribose** a **deoxyribose**

ribosa součástí **R**NA, **d**eoxyribose součástí **D**NA
číslování



Deoxyribose



Ribose

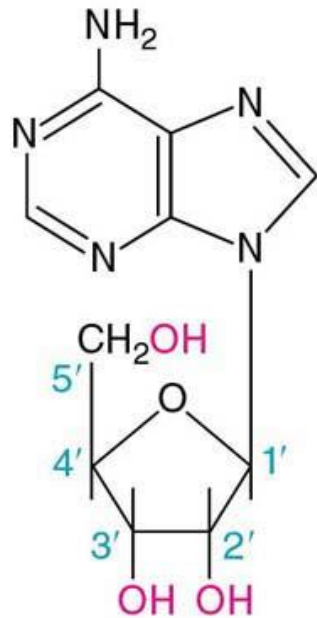
Nukleosidy

vazba sacharid - báze je N-glykosidická

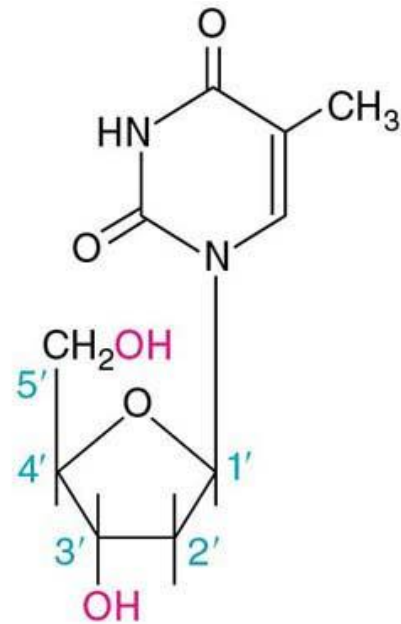
Adenosin, guanosin

Cytidin, thymidin, uridin

+ deoxy-



Adenosine



2' -deoxythymidine

Nukleotidy

nukleotid je nukleosid**mono(di, tri)**fosfát (fosfátový ester na C₅ pentosy)

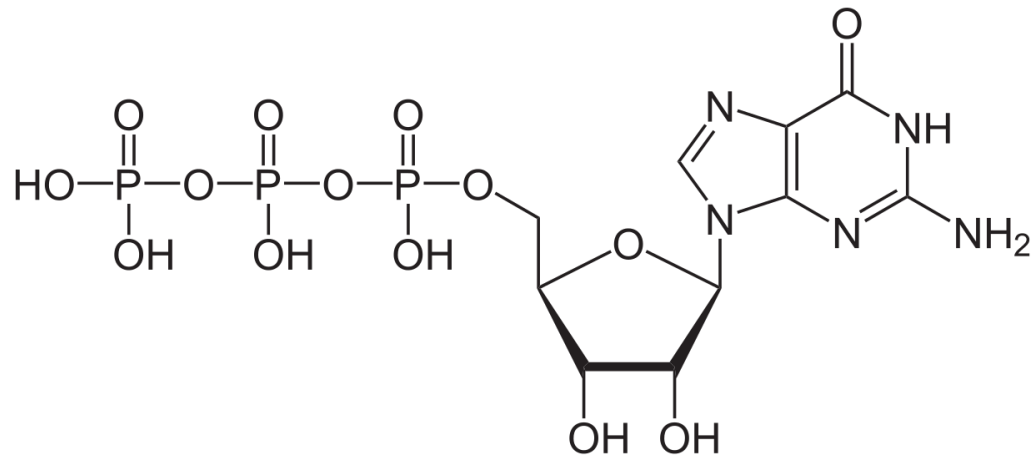
(d)Nukleosid(mono)fosfáty

- adenosin**mono**fosfát - AMP
- guanosin**mono**fosfát - GMP
- citidin**mono**fosfát - CMP
- tymidin**mono**fosfát - TMP
- uridin**mono**fosfát - UMP

Další fosforylace - anhydridy

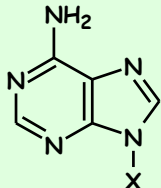
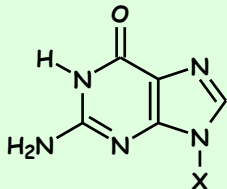
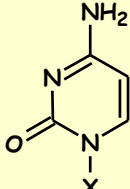
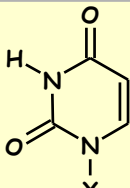
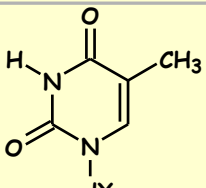
(d)Nukleosid**di**fosfáty

(d)Nukleosid**tri**fosfáty



guanosinotriphosfát

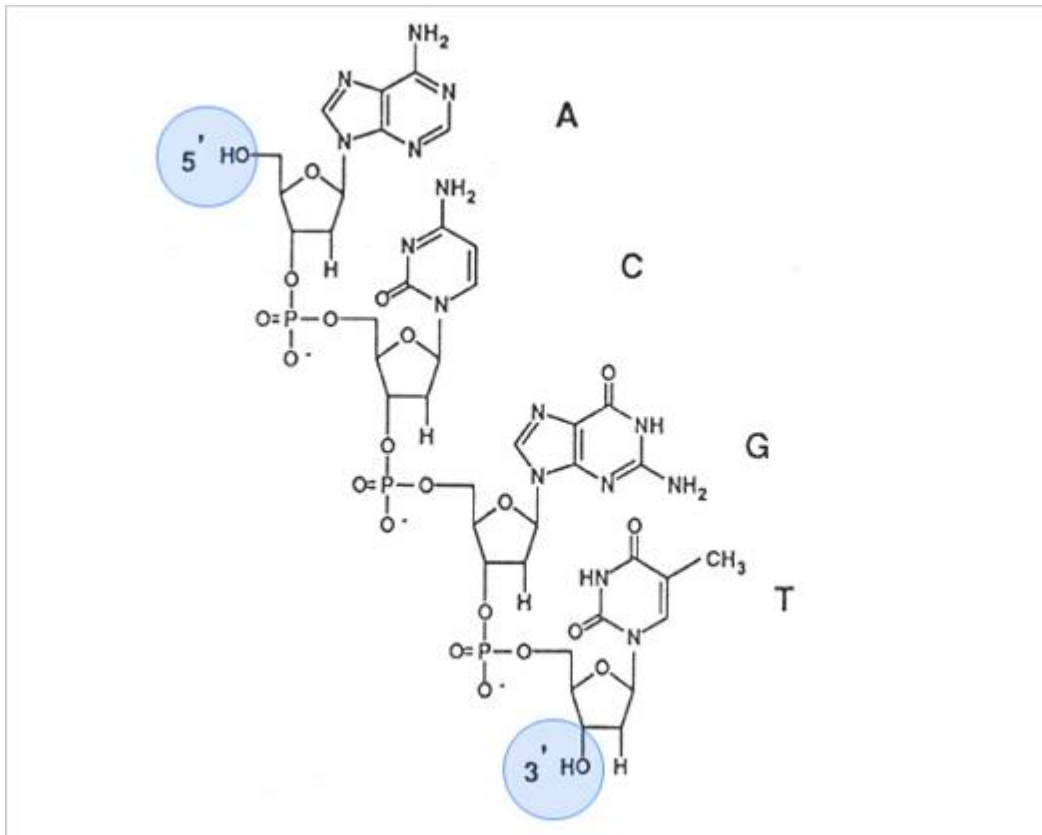
Názvy a zkratky bází nukleových kyselin, nukleosidů a nukleotidů

Strukturní vzorec	Báze (X = H)	Nukleosid (X = ribosa, 2'-deoxyribosa)	Nukleotid (X = ribosafosfát, 2'-deoxyribosafosfát)
	Adenin Ade A	Adenosin Ado A	Adenylová kyselina Adenosinmonofosfát AMP
	Guanin Gua G	Guanosin Guo G	Guanosylová kyselina Guanosinmonofosfát GMP
	Cytosin Cyt C	Cytidin Cyd C	Cytidylová kyselina Cytidinmonofosfát CMP
	Uracil Ura U	Uridin Urd U	Uridylová kyselina Uridinmonofosfát UMP
	Thymin Thy T	Deoxythymidin dThd dT	Deoxythymidylová kyselina Deoxythymidinmonofosfát dTMP

Oligo a polynukleotidy

primární struktura

je určena sledem nukleotidových zbytků
vzniká spojováním nukleotidů **fosfodiesterovou vazbou**



nomenklatura

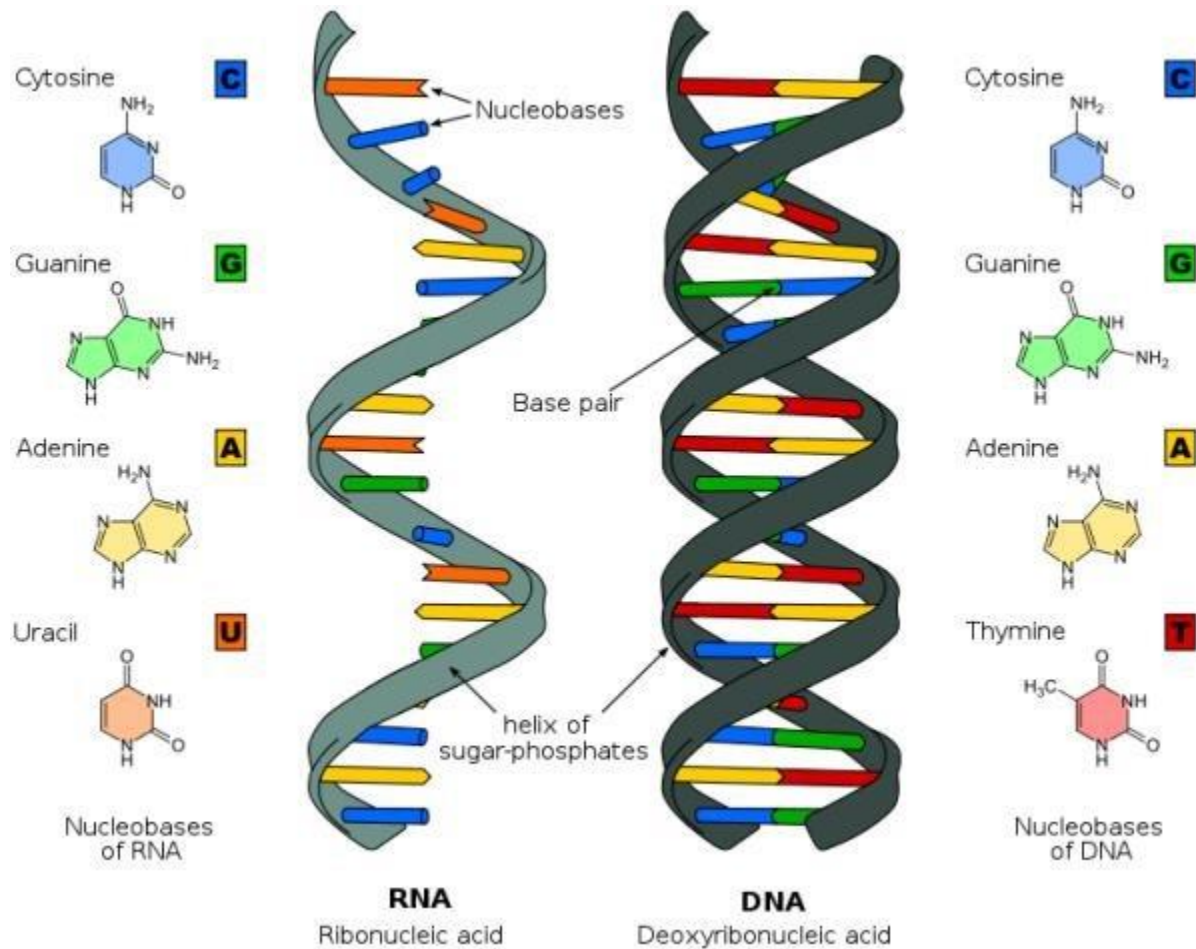
zkrácený zápis struktury
vždy od 5' konce
ACGT

Chemické složení

Deoxyribosa x ribosa
Thymin x uracil

sekundární struktura

DNA - antiparalelní dvoušroubovice



cesta k rozluštění sekundární struktury (DNA)

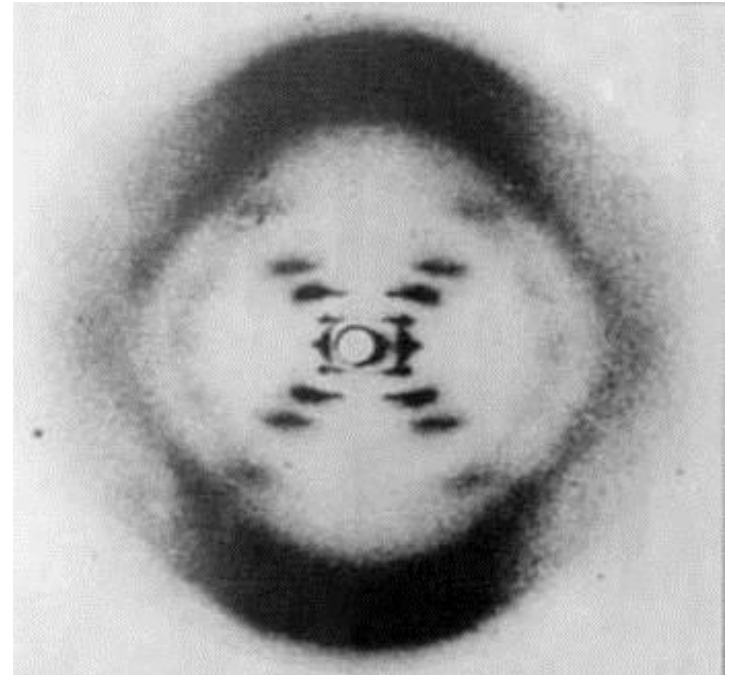
Chragaffova pravidla (poměr bazí v DNA)
ukázala na to, co s čím se páruje

$$A = T \quad G = C$$

J. Donohue - báze v tautomerních oxoformách
ukázal na to, jakými interakcemi se páruje

R. Franklinová - RTG difrakční analýza

J. Watson, F. Crick (1953) - dvojšroubovice

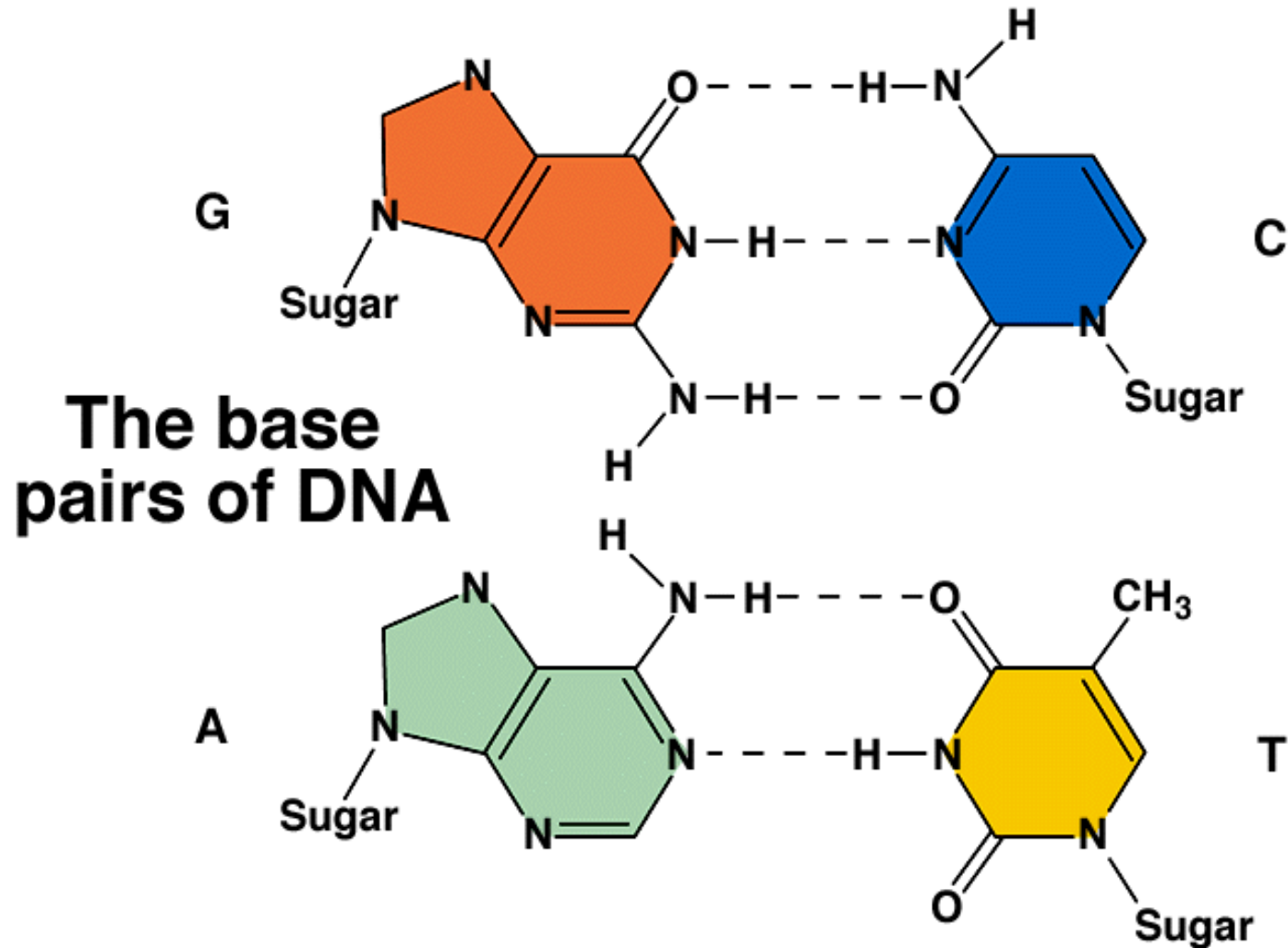


Komplementarita (párování) bází

spojování bází vodíkovými vazbami

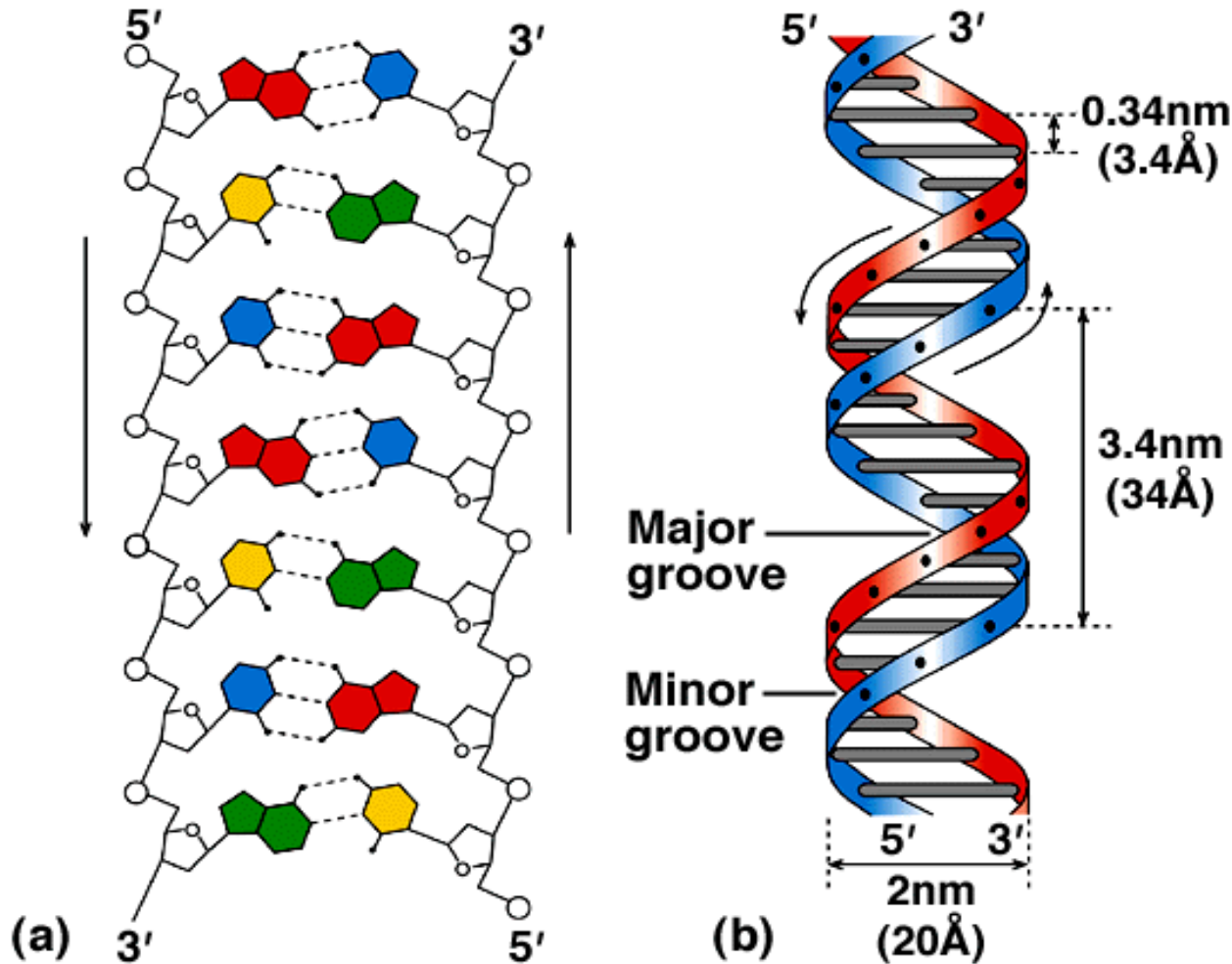
H-můstky 2 u A-T, 3 u G-C

nezaměnitelnost bází vede ke komplementaritě vláken



struktura DNA

monosacharid + fosfát lokalizace vně šroubovice - hydrofilní povrch
báze lokalizovány dovnitř - hydrofobní
dvoušroubovice má dva žlábků velký (mělký a široký) a malý (hluboký a úzký)
řetězce mají antiparalelní uspořádání

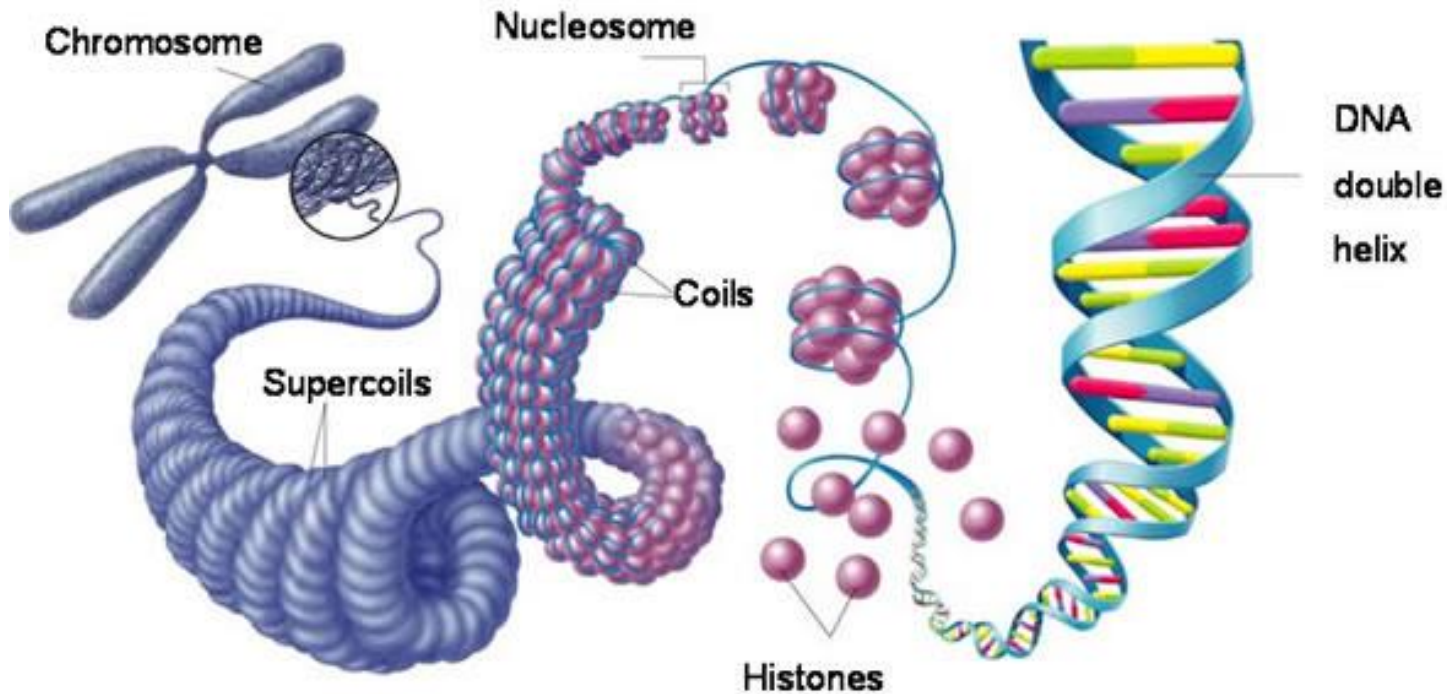
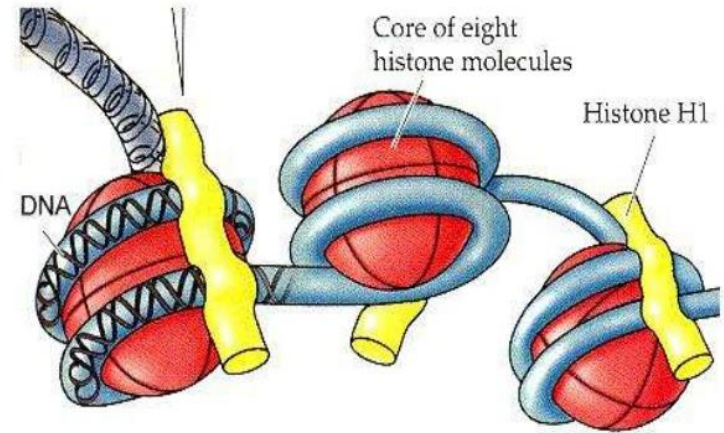


struktura DNA eukaryot

histony

vysoký kladný náboj (Lys, Arg)
reverzibilní interakce s DNA (fosfát)

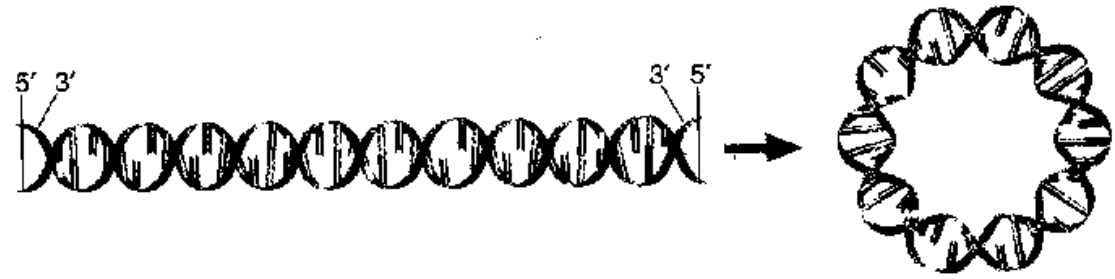
nukleosom s histonem H1



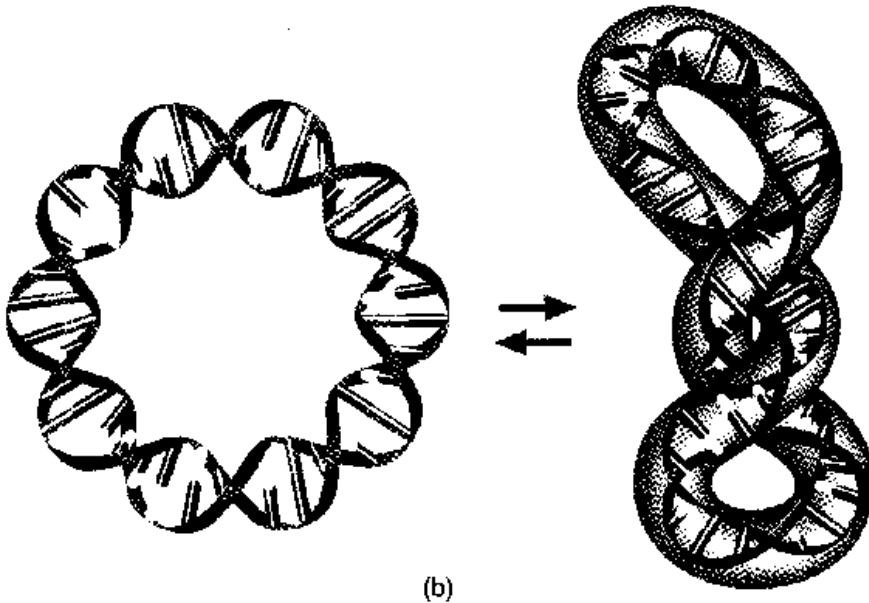


www.dnalc.org

struktura DNA prokaryot



většina prokaryot (bakterie, archea) obsahuje jeden cirkulární chromozom - uložen v nukleoidu
obsahují pouze jednu kopii genu (haploidní)
neesenciální geny uloženy v plasmidech mimo nukleoid



srovnání RNA x DNA

chemické složení

- thymin x uracil
- deoxyribosa x ribosa

tvar

- DNA dvoušroubovice
- RNA jedno vlákno

biologický význam

DNA „knihovna“, RNA „návod“ - odráží velikost molekuly a životnost

historie

„RNA svět“

Viry jsou vyjímka

základní typy RNA

rRNA

ribosomální - 80 %

tRNA

transferová, přenosová - 10-15 %

60 tRNA

mRNA

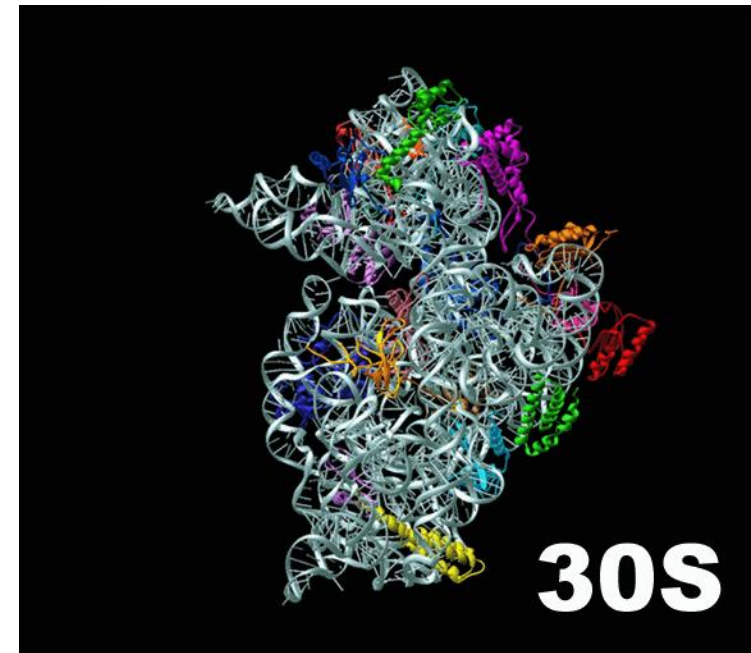
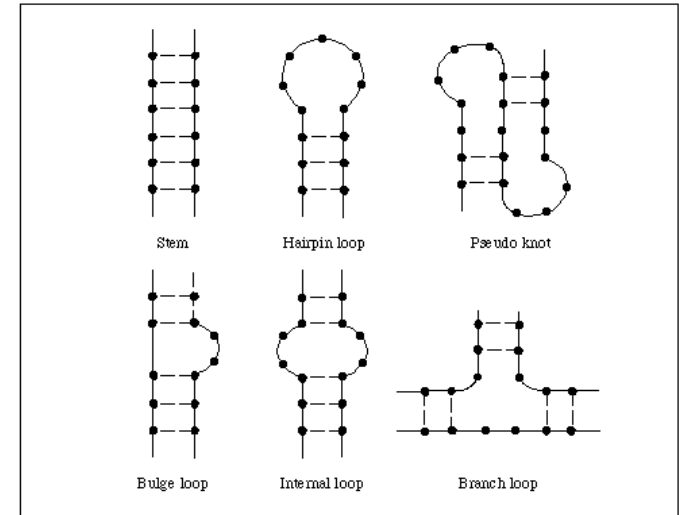
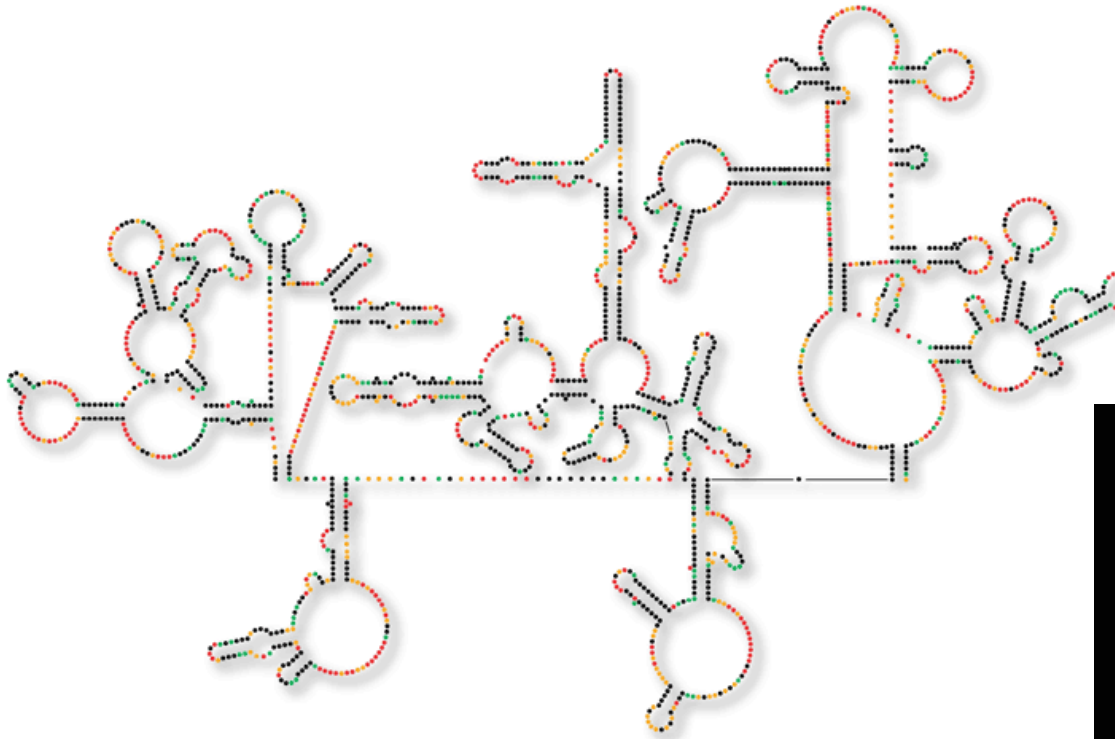
mediátorová, messenger
informační - 5-10 %

RNA molekuly u *E. coli*

	Relativní zastoupení (%)	Molekulová hmotnost (kD)	Počet nukleotidů	Sedimentační koeficient (S)
rRNA	80	1.2×10^3	3700	23
		0.5×10^3	1700	16
		3.6×10^1	120	5
tRNA	15	2.5×10^1	75	4
mRNA	5	různé		

struktura rRNA a mRNA

jedno vlákno s množstvím komplementárních úseků



struktura tRNA

Typické úseky

Komplementární úseky - stabilizace

Otevřené rameno - vazba AMK

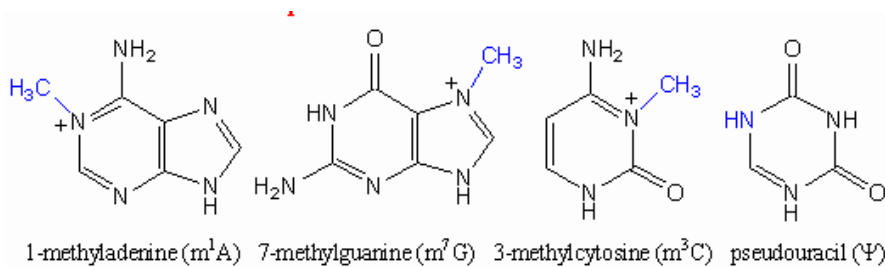
Antikodonové rameno

Variabilní - rozlišovací vlastnost pro AMK

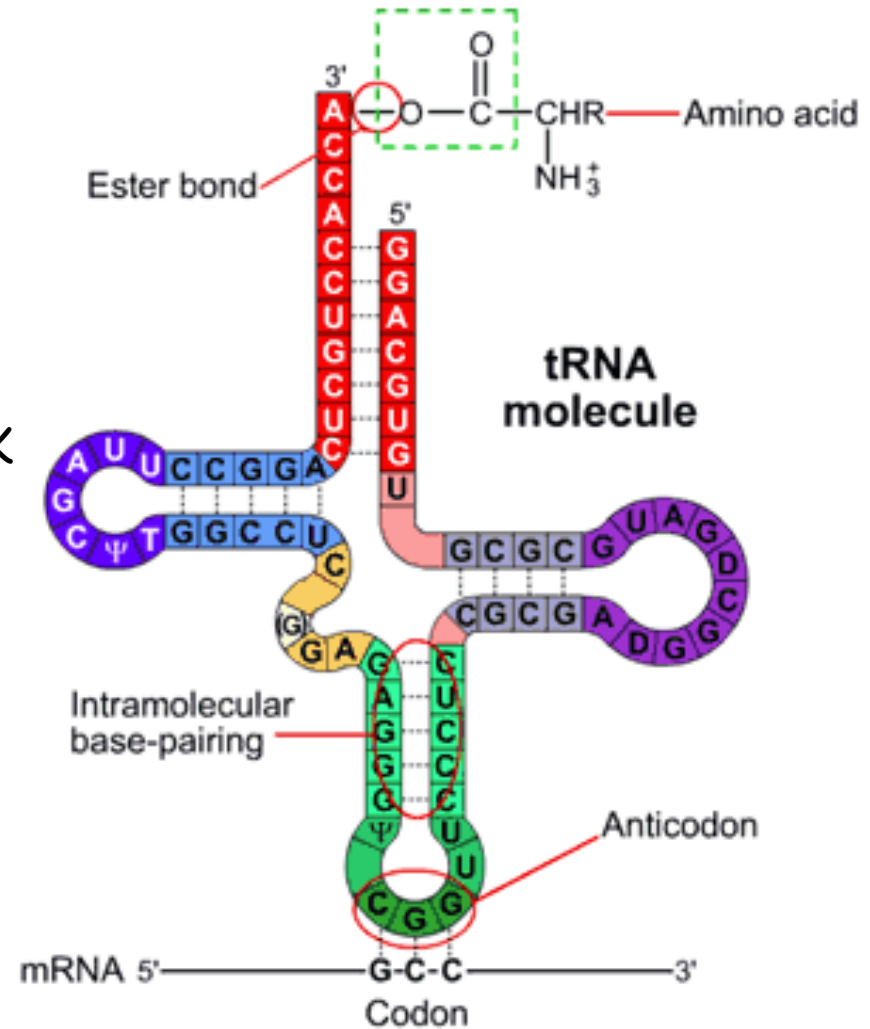
Neobvyklé nukleotidy

Vysoká specificita

Projekce do roviny - jetelový list



Neobvyklé báze variabilního raménka



Nukleové kyseliny - vlastnosti

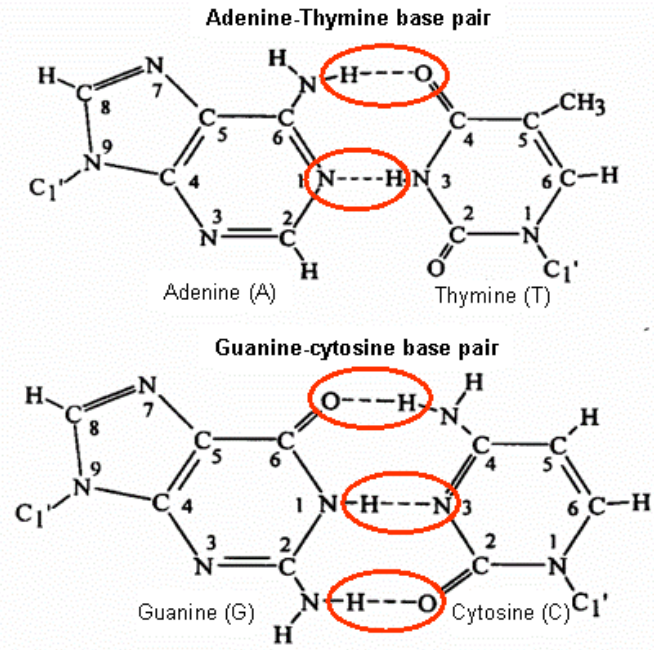
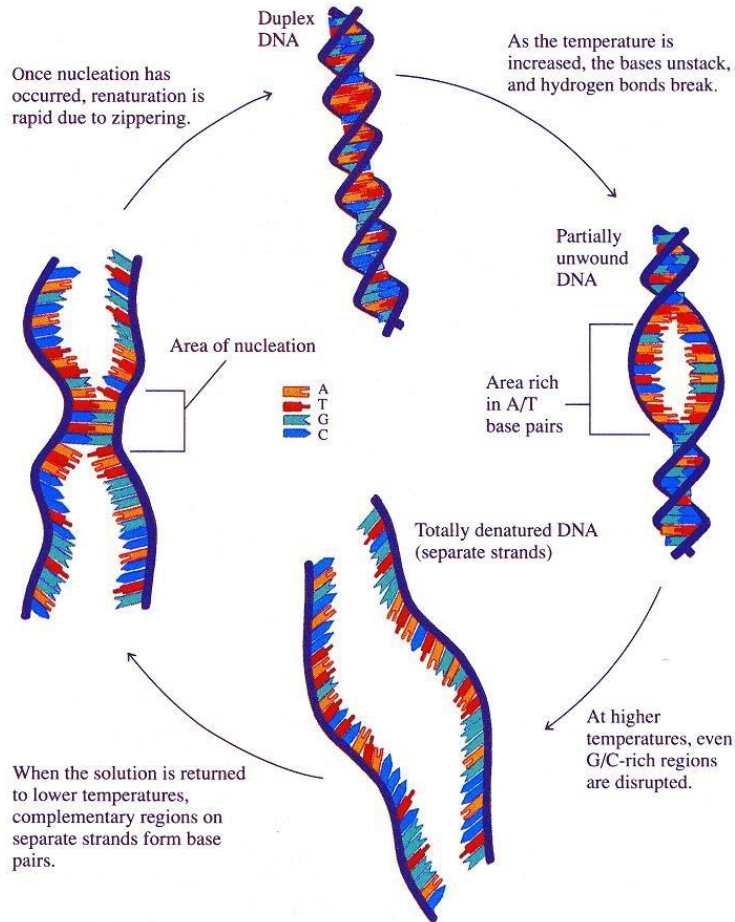
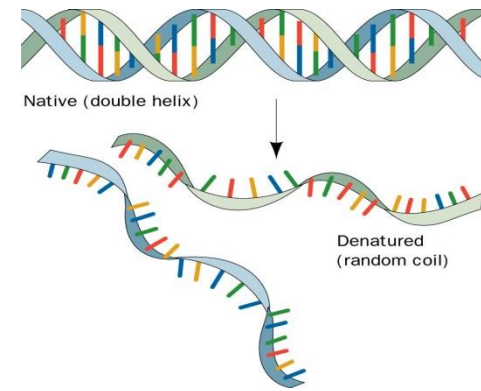
Denaturace a renaturace DNA

Spektrofotometrie

Sekvenace nukleových kyselin (chemická)

denaturace a renaturace DNA

zvyšování teploty - postupné rušení vodíkových můstků
 nejdříve A-T pak C-G
 proces je vratný (x denaturace proteinů)
 využití (hybridizace, PCR, genové inženýrství ...)



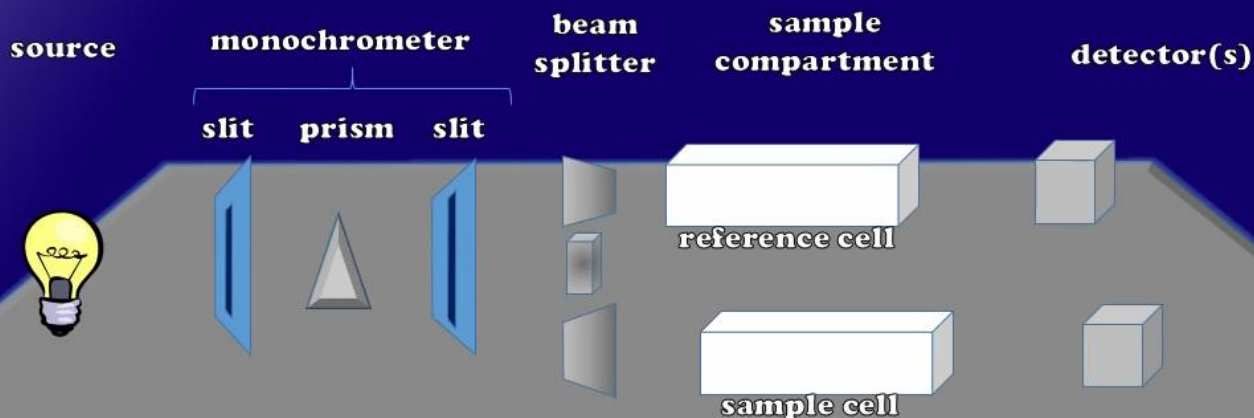
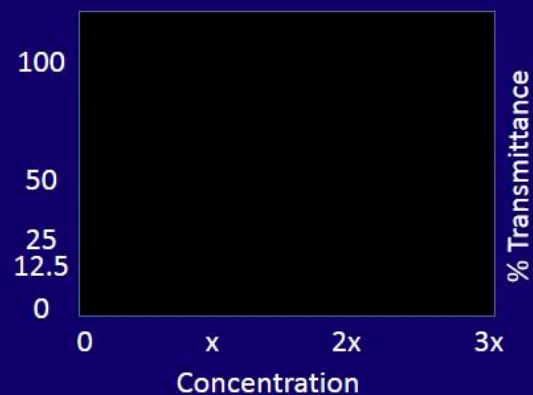
Spektrofotometrie

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Lambert Beerův zákon

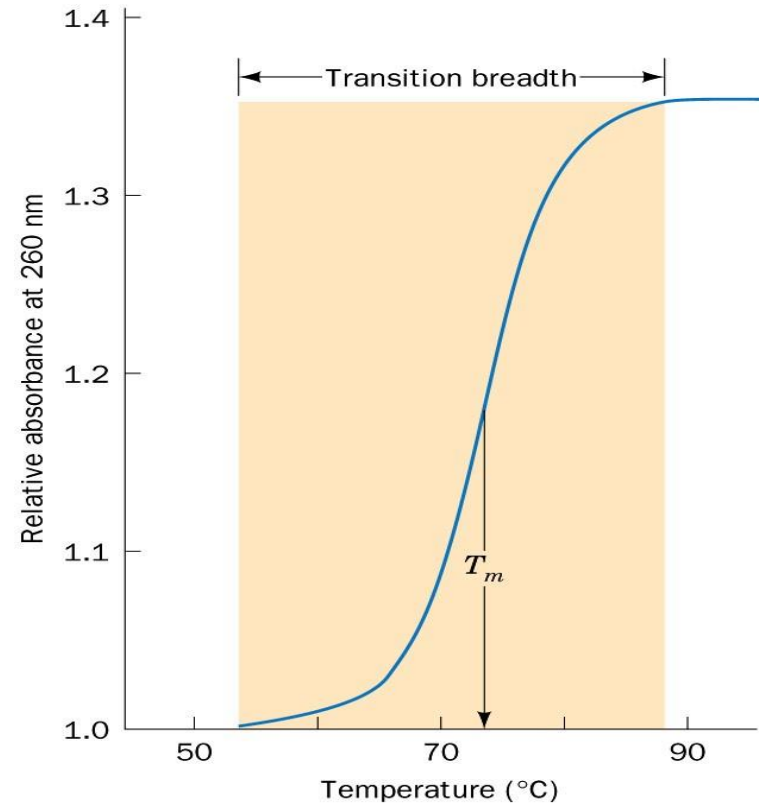
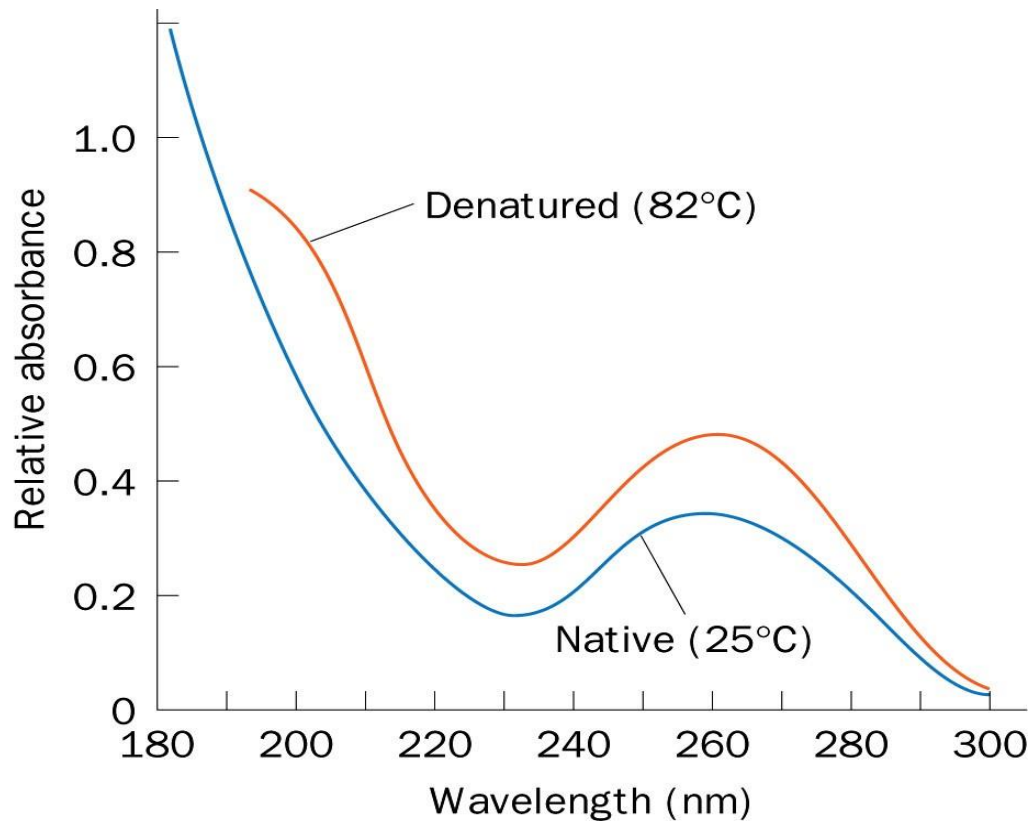
I_0 - intenzita světla „vstupní“, I - intenzita světla „výstupní“, ε - molární absorpční (extinkční) koeficient
 c - koncentrace měřené látky, d - optická dráha

UV-visible Spectroscopy and the Beer-Lambert Law



denaturace a renaturace DNA

Ize sledovat spektrofotometricky - světelná absorpce vyšší u oddělených bází
na teplotu tání DNA má vliv mnoho faktorů (pH, ionty, zastoupení bází)

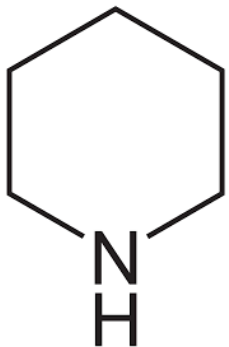


Určení primární struktury nukleových kyselin

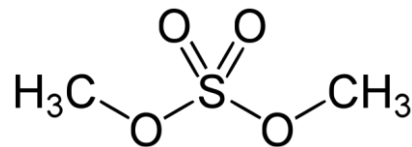
Maxam-Gilbertova chemická metoda

Specifické štěpení řetězce v místě dané báze

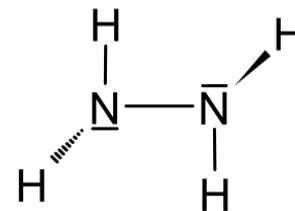
- G - **DMS**, piperidin
 - A+G - **DMS** + kys. mravenčí, piperidin
 - T+C - **hydrazin**, piperidin
 - T - **hydrazin** + NaCl, piperidin
-
- Pracná, málo efektivní, ale univerzální a nezávislá na vstupních datech



piperidin

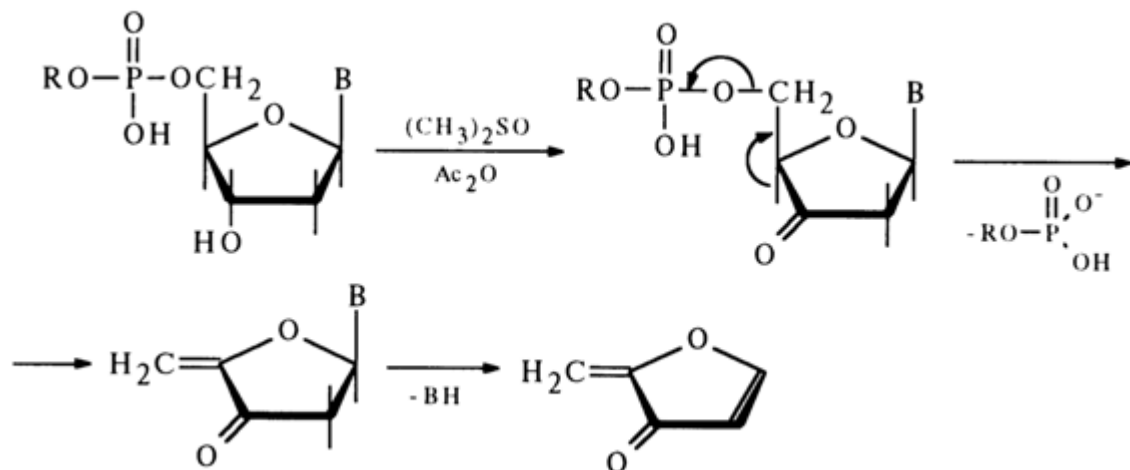


dimetylsulfát

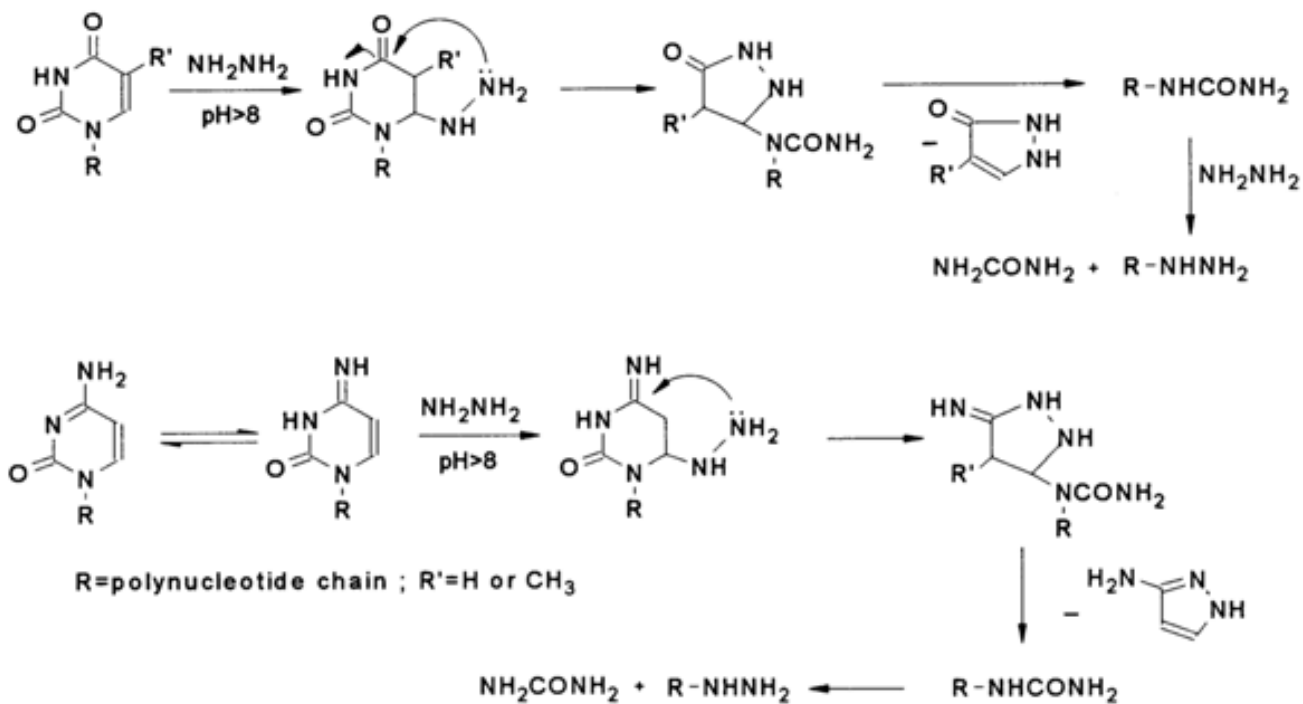


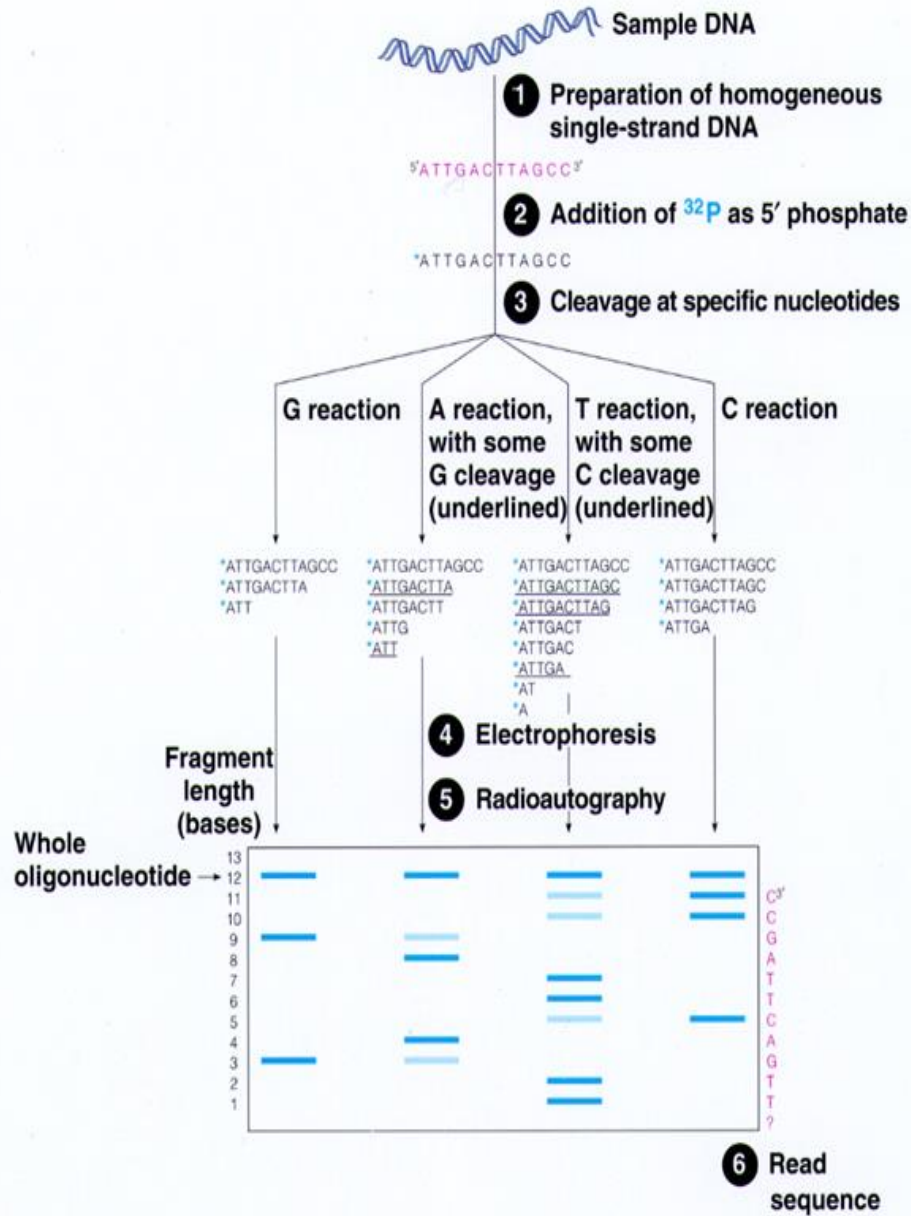
hydrazin

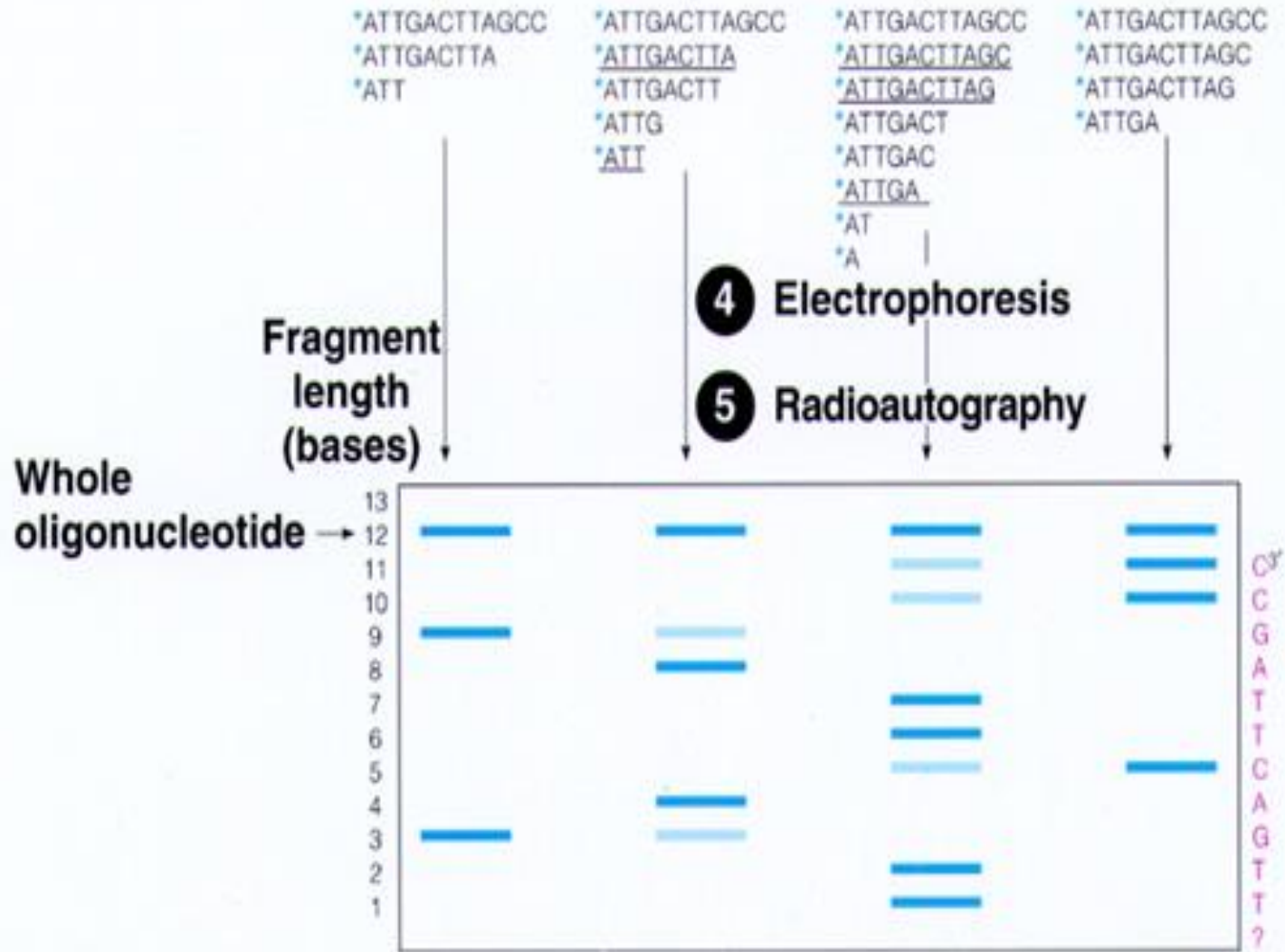
Odštěpení purinu vlivem dimetylsulfidu (DMS nebo DMSO)



Hydrazinolýza pyrimidinu







G reakce A reakce T reakce C reakce

DNA Sequencing –
The Maxam & Gilbert
Method
Or
The Chemical Sequencing
Method

Syntéza nukleových kyselin

Syntéza na pevné fázi - první monomer zakotven na nosiči

Cyklický proces (automatizace)

Deblokace reagujících skupin - vazba přes aktivované skupiny - promývání

Využití - příprava primerů, umělých genů ...

