

Metódy delenia a kvantitatívneho stanovenia nukleových kyselín

Z. LEŠKOVÁ, D. LONGAUEROVÁ

Kyselina ribonukleová a deoxyribonukleová sú polyméry nukleotidov s vysokou molekulovou váhou. Nukleotid je kombináciou purínovej alebo pyrimidínovej bázy s fosforylizovaným cukrom. Kyselina ribonukleová sa odlišuje svojím zložením od kyseliny deoxyribonukleovej v tom, že obsahuje ribózu a pyrimidínovú bázu uracil; kyselina deoxyribonukleová obsahuje deoxyribózu a tymín. Purínové bázy adenín a guanín a pyrimidínová báza cytozín sú spoločné pre obe nukleové kyseliny. Niektoré kyseliny deoxyribonukleové obsahujú aj 5-metylcytozín, iné deoxyribonukleové kyseliny napríklad T-bakteriofága obsahuje 5-hydroxymetylcytozín. V neporušených nukleových kyselinách sú jednotlivé nukleotidy spojené navzájom fosfátovou skupinou. Hydrolýzou nukleotidov môžeme získať nukleozidy, ktorých bázy sú viazané k cukornej zložke, resp. voľné bázy, cukornú zložku (ribózu alebo deoxyribózu) a kyselinu fosforečnú. Pyrimidínové nukleotidy sa ťažšie hydrolyzujú ako purínové (1, 2).

Chemické metódy stanovenia nukleových kyselín sú založené na viac alebo menej špecifických reakciách na stanovenie obsahu fosforu, cukru alebo obsahu purínu alebo pyrimidínu.

Vzhľadom na to, že obe nukleové kyseliny — ribonukleová a deoxyribonukleová majú spoločnú vlastnosť, t. j. obsah fosforu a UV absorpciu purínov a pyrimidínov, je jasné, že najprv sa musia kvantitatívne separovať obe nukleové kyseliny a až potom sa stanoví každá nukleová kyselina zvlášť. Najrozšírenejšie používané na delenie nukleových kyselín sú metódy Schmidt-Thannhauserova (3) a Ogur-Rosenovej (4).

Metódy, ktoré sa zakladajú na rozdieloch medzi cukornými zložkami kyseliny ribonukleovej a deoxyribonukleovej, nepožadujú separáciu oboch nukleových kyselín. Na tomto je založená Schneiderova metóda (5).

Pri použití akejkoľvek metódy delenia nukleových kyselín musí byť analyzovaný materiál najprv dôkladne rozrušený, pretože od toho sú závislé tak úplné odstránenie interferujúcich substancií ako aj nasledujúci hydrolyzačný postup. Za týmto účelom sa vyvinuli rôzne typy homogenizátorov ako napríklad tzv. Waring Blendor, sklenený alebo teflonový tkáňový homogenizátor, na rozrušenie buniek mikroorganizmov dezintegrácia ultrazvukom (6), alebo homogenizácia so skleným práškom (7) a iné.

Podľa Bonnara a Duggana (8) podmienky, za ktorých sa tkanivá alebo mikroorganizmy skoncentrujú, uchovávajú a spracujú predtým než sa extrahujú nukleové kyseliny, majú značný vplyv na výsledky. V dôsledku toho vzorky skúmaného materiálu majú sa spracovať ihneď po odobratí, v prípade kde to nie je možné, treba ich ihneď zmraziť. V priebehu homogenizácie musí sa materiál udržiavať v chlade.

Tkanivá, tkanivové extrakty alebo mikroorganizmy obsahujú okrem kyseliny ribonukleovej a kyseliny dezoxyribonukleovej aj iné látky, ktoré absorbujú v UV oblasti. Sú to menovite koenzýmy, adenzíntrifosfát, bielkoviny a pod., trichlóroctová kyselina, ktorá sa tam dostáva následkom spracovania materiálu. Ďalej látky, ktoré reagujú s orcinolom alebo difenylaminom, napríklad glukóza, glykogén, mukopolysacharidy, bielkoviny alebo aminokyseliny a nakoniec sú tam látky, ktoré obsahujú fosfor, napríklad v kyslom prostredí rozpustné cukorné fosforečnany, anorganické fosforečnany, fosfolipidy, bielkovinové fosforečnany, metafosforečnany, koenzýmy, adenzíntrifosfát a pod.

Preto pred vlastným stanovením kyseliny ribonukleovej a kyseliny dezoxyribonukleovej po uvedenom dôkladnom zhomogenizovaní sa skúmaný materiál podrobí viacstupňovej extrakcii, pri ktorej sa odstráni tento interferujúci materiál.

V kyseline rozpustné zlúčeniny odstraňuje sa 5—10 %-nou trichlóroctovou kyselinou u metód Schmidt—Thannhauserovej a Schneiderovej, príp. u Ogur—Rosenovej metódy 0,2 normálnu kyselinou chloristou; lipidy sa odstraňuje extrakciou s alkoholom, zahriatou zmesou alkohol—chloroform alebo alkohol—éter.

Pri výbere vhodného postupu pre odstránenie rušiacich látok treba mať na zreteli

- a) chemické vlastnosti nukleových kyselín, hlavne zložky ktoré sa majú stanoviť,
- b) chemické vlastnosti tých komponentov, ktoré by rušili konečné stanovenie, ak by sa vhodným spôsobom predtým nerozrušili alebo neodstránili.

Metóda Schmidt—Thannhauserova

Po odstránení interferujúcich látok zvyšok skúmaného materiálu sa cez noc hydrolyzuje pri 37 °C normálnym roztokom hydroxydu draselného. V priebehu alkalickéj hydrolyzy sa rozkladá kyselina ribonukleová na nukleotidy rozpustné v kyseline, zatiaľ čo kyselina dezoxyribonukleová sa veľmi nerozruší a vyzráža sa z kyselého roztoku. Obe nukleové kyseliny môžu sa stanoviť na základe obsahu fosforu metódou Fiske—Subbarowa (9), prípadne spektrofotometricky v UV oblasti.

Pri stanovení množstva fosforu v oddelených nukleových kyselinách chyby môžu pochádzať najmenej z dvoch zdrojov:

1. pri odstraňovaní interferujúcich látok neeliminujú sa úplne iné fosfor obsahujúce zložky, ako bolo uvedené už v predchádzajúcej časti,
2. nedostatočne sa oddelí kyselina ribonukleová od kyseliny dezoxyribonukleovej.

Pri spektrofotometrickom stanovení nukleových kyselín je vhodnejšie použiť na hydrolyzu kyselinu chloristú, nakoľko táto len nepatrne absorbuje pri 260 nm zatiaľ čo v tejto oblasti má kyselina trichlóroctová značnú absorpciu, čo môže skresliť výsledky.

Metóda delenia nukleových kyselín podľa Ogur—Rosenovej je založená na rozdielnej rozpustnosti kyseliny ribonukleovej a dezoxiribonukleovej v kyseline chloristej, ktorá sa prejavuje v tom, že metodicky spresnené množstvo kyseliny ribonukleovej sa rozpúšťa v normálnej kyseline chloristej v chlade (4 °C) za určený čas (18 hodín), zatiaľ čo kyselina dezoxiribonukleová za týchto podmienok sa nerozpúšťa. Kyselina dezoxiribonukleová sa rozpúšťa v polnormálnej kyseline chloristej za tepla (70 °C), za 20 minút.

Kvantitatívne stanovenie kyseliny ribonukleovej a dezoxiribonukleovej vo frakciách sa robí obvykle spektrofotometricky v UV oblasti, ale môže sa opäť stanoviť aj na základe obsahu fosforu alebo cukorných zložiek.

Metóda Ogur—Rosenovej bola pôvodne vypracovaná na stanovenie malých množstiev kyseliny ribonukleovej a dezoxiribonukleovej vo vegetačnom vrchole rastlín. Zistilo sa však, že ju možno použiť na delenie nukleových kyselín iného pôvodu, najmä mikroorganizmov, i keď nie vo všetkých prípadoch sa dosiahnu rovnako dobré výsledky.

Schneiderová metóda

Pri tejto metóde sa podobne ako pri uvedených pracovných postupoch odstraňuje rušivé látky a vyčistený substrát sa zahrieva podľa pôvodného predpisu (5) v 5 %-nej trichlóroctovej kyseline alebo v modifikovanej úprave (10) v 6 %-nej kyseline chloristej po dobu 15 minút pri teplote 90—95 °C. Obe nukleové kyseliny sa pritom súčasne hydrolyzujú a takýmto spôsobom sa oddelia od bielkovín, ktoré zostanú v sedimente.

Nakoľko pri hydrolýze nastane rozpad ako u kyseliny ribonukleovej tak aj u dezoxiribonukleovej sa prislúšné nukleotidy, prípadne až na voľné bázy, rozdelenie nukleových kyselín týmto spôsobom nie je možné a tieto sa stanovia jedine pomocou špecifických reakcií na pentózu a dezoxypentózu.

Kolorimetrické metódy na stanovenie kyseliny dezoxiribonukleovej

Tieto metódy sú založené na stanovení obsahu cukornej zložky nukleových kyselín. Tieto však dávajú reakcie zo všetkými 2-dezoxycukrami a nielen s 2-dezoxiribózou. Vzhľadom na to, že v prírode sa 2-dezoxycukry alebo ich zmesi vyskytujú mimo kyseliny dezoxiribonukleovej len veľmi vzácnne, je táto znížená špecifičnosť v praxi zanedbateľná.

Najznámejšou a najpoužívanejšou metódou na stanovenie kyseliny dezoxiribonukleovej je pracovný postup, ktorý popísal už v roku 1930 Dische (11). Podľa tejto metódy je mierou množstva kyseliny dezoxiribonukleovej intenzita modrého zafarbenia, ktoré vzniká reakciou kyseliny dezoxiribonukleovej so zmesou iadovej kyseliny octovej, koncentrovanej kyseliny sírovej a difenylaminu pri zahriatí na 100 °C po dobu 10 minút.

Medzi navrhnuté metódy na stanovenie kyseliny dezoxiribonukleovej patrí aj metóda Webba a Levyho (12). Kyselina dezoxiribonukleová reaguje

s p-nitrofenylhydrazínom v prostredí kyseliny trichlóroctovej za vzniku fialovej farby, ktorej intenzita sa meria spektrofotometricky pri 560 nm. V niektorých prípadoch ňou možno dosiahnuť lepšie výsledky ako Discheho metódou.

Dische (13) popísal aj reakciu kyseliny dezoxyribonukleovej s indolom v prostredí kyseliny soľnej. Princíp metódy spočíva v tom, že kyselina dezoxyribonukleová v prostredí kyseliny soľnej za tepla reaguje s indolom za vzniku žltohnedej farby, ktorej intenzita sa meria spektrofotometricky pri 490 nm.

Kolorimetrické metódy na stanovenie kyseliny ribonukleovej

Kolorimetrické metódy na kvantitatívne stanovenie kyseliny ribonukleovej postrádajú tej špecifičnosti, ktorými sa vyznačili metódy pre stanovenie kyseliny dezoxyribonukleovej. Sú založené na viac alebo menej špecifických reakciách na pentózy, ich nedostatkom však je, že reagujú aj na niektoré iné cukorné látky. Určitý stupeň špecifičnosti reakcie sa dosiahne presne definovanými podmienkami (acidita, teplota a pod.), ktoré sú optimálne pre premenu ribózy na furfural alebo na jeho deriváty pri minimálnej premene iných cukrov. Vytvorený furfural alebo jeho deriváty potom reagujú s rôznymi chromogénymi látkami. Najpoužívanějšími metódami stanovenia kyseliny ribonukleovej sú Mejbaumova orcinolova metóda (14) a metóda Eulera a Hahna (15), ktorá používa ako chromogénnu látku fluoroglucinol. Pri stanovení orcinolom treba brať do úvahy rušiaci vplyv kyseliny dezoxyribonukleovej, ktorá znižuje presnosť výsledkov a preto je jej dokonalé odstránenie prvoradým predpokladom reprodukovateľnosti. V metóde používajúcej fluoroglucinol (15) prítomnosť kyseliny dezoxyribonukleovej neovplyvňuje konečný výsledok, ale metóda je menej citlivá než s orcinolom. Ako katalyzátor chromogénnej reakcie sa používa v uvedených metódach chlorid železitý, pri niektorých iných modifikáciách orcinolovej metódy sa používa chlorid vápenatý (16).

Z iných metód stanovenia ribonukleovej kyseliny treba spomenúť metódu Webba (17), v ktorej furfural vytvorený z kyseliny ribonukleovej sa zachytuje v xyléne, xylénový extrakt reaguje s p-bromfenylhydrazínom a intenzita vzniklého sfarbenia sa meria spektrofotometricky pri 450 nm. Reakciu ruší prítomnosť kyseliny galakturonovej.

Spektrofotometrické stanovenie nukleových kyselín

Hydrolýza nukleových kyselín kyselinou trichlóroctovou alebo kyselinou chloristou dáva extrakt, v ktorom sa môžu obe nukleové kyseliny merať priamo na základe charakteristickej absorpcie svetla v UV oblasti. Absorpcia nukleových kyselín v UV oblasti je spôsobená systémom konjugovaných dvojných väzieb, ktoré sú v purínových a pyrimidínových jadrách nukleotidov. Obe nukleové kyseliny — kyselina ribonukleová a kyselina dezoxyribonukleová majú charakteristické spektrum s maximom pri 263 nm a minimom pri 227 nm. (18). Zahrievanie s kyselinou chloristou posunuje maximum kyseliny dezoxyribonukleovej na 265 až 268 nm. Spektrum nukleových kyselín sa mení

podľa stupňa denaturácie nukleových kyselín a podľa obsahu báz nukleových kyselín.

Výpočet množstva nukleových kyselín sa vzťahuje najlepšie podľa Chargaffa a Zamenhofa (19) na obsah fosforu v nukleových kyselinách. Pretože nukleové kyseliny obsahujú na dusikátú bázu 1 atom fosforu, odvodzujú uvedení autori tzv. molárny extinkčný koeficient (ϵ P), vzťahujúci sa na gram-atom fosforu v 1 litri:

$$(\epsilon \text{ P}) = \frac{30,92 \text{ E}}{dc} \text{ a z toho } c = \frac{30,92 \text{ E}}{(\epsilon \text{ P}) d}$$

kde E je nameraná extinkcia; c koncentrácia fosforu v g/l; d vnútorná šírka kvety v cm; (ϵ P) molárny extinkčný koeficient ktorý vzhľadom na meniace sa spektrum nukleových kyselín pre kyselinu dezoxiribonukleovú je 6000 až 8000, pre kyselinu ribonukleovú 8000—11 000 (20).

Molárny koeficient meraný za konštantných podmienok je ukazovateľom nativnosti, resp. stupňa denaturácie vzorky. Pri posudzovaní čistoty vzorky podľa spektra treba mať na zreteli, že nukleová kyselina má mať nepatrnú absorpciu pri 310 nm a že posunutie maxima k vyšším vlnovým dĺžkam ukazuje na znečistenie obzvlášť bielkovinami.

Niektorí pracovníci ako napríklad Canev a Markov (21) v snahe znížiť vplyv prímies na minimum, odporúčajú meranie pri dvoch vlnových dĺžkach a to kyselinu ribonukleovú pri 260 a 286 nm a kyselinu dezoxiribonukleovú pri 268 a 284 nm.

Delenie báz, nukleozidov a nukleotidov

Chromatografia na papieri spolu s chromatografiou na iontomeničoch a elektroforézou na papieri hrajú dôležitú úlohu pri kvantitatívnom a kvalitatívnom stanovení komponentov nukleových kyselín a tiež pri sledovaní špecifičnosti nukleáz.

Papierová chromatografia je vhodná pre delenie purínových a pyrimidínových báz a nukleozidov. Pre nukleotidy je hlavnou deliacou metódou elektroforéza na papieri a chromatografia na iontomeničoch. Výhoda delenia spočíva tiež v intenzívnej absorpcii UV lúčov purínovými a pyrimidínovými zlúčeninami, čo uľahčuje detekovanie na papieri a dáva možnosť ich priameho spektrofotometrického stanovenia po rozdelení. Na túto metodickú výhodu poukázali už v rokoch 1947—1948 Vischer a Chargaff (22) a tiež Hotchkiss (23).

Detekcia. Metódy na detekciu komponentov nukleových kyselín rozdeľujeme na chemické a fyzikálne. Chemické metódy sa dnes pomerne málo používajú, treba z nich spomenúť predovšetkým detekciu ortuťnatými soľami (22, 24). po odstránení prebytočnej ortuti sa jej fixovaná časť, ktorou bázy a nukleozidy tvoria nerozpustné komplexy, prevedie na siriak ortuťnatý. Ďalšia metóda je založená na prevedení báz a nukleozidov na strieborné soli (25). Podľa Michla (26) možno puríny stanoviť tiež tak, že ortuťnaté komplexy sa farbia eozínom. Ako to už bolo spomenuté, najdôležitejšie detekčné metódy sú fyzikálne, založené na absorpcii v UV oblasti. Využíva sa pritom to, že v svetle UV lampy vybavenej zvláštnym filtrom (Minerallight, Chromatolite),

ktorá má veľkú emisiu v oblasti maxima absorpcie nukleových kyselín, vystupujú purínové a pyrimidínové zlúčeniny v podobe škvŕn na fluoreskujúcom pozadí chromatografického papiera. V poslednom čase sa veľa pracuje s rádioizotopmi, ktoré umožňujú presnejšie stanoviť rozdelené látky.

Obyčajne sa používa chromatografia zostupná na papieri Whatman 1 a ako rozpúšťadlá sa používajú alkoholy a to predovšetkým n-butanol, izopropanol a po prípade amylalkohol. Používa sa ich v zmesi s vodou, kyselinou, niekedy tiež s roztokmi solí.

Kvantitatívne stanovenie. Pre kvantitatívne určenie škvŕny, ktoré sa našli a zakreslili v UV Vischer a Chargaff (23) aby sa vyhli chybám podmieneným prítomnosťou prímiesí absorbujúcich v UV oblasti, merali extinkciu všetkých eluátov v oblasti maximálnej a minimálnej absorpcie látky.

Delenie elektroforézou na papieri. Elektroforetické metódy sú založené na nerovnakej pohyblivosti komponentov v elektrickom poli. Elektroforéza sa hodí najmä pre nukleotidy. Výhoda elektroforézy na papieri spočíva aj v tom, že je ňou možné deliť aj veľmi malé množstvá látok. Rozdelenie je možné na základe aminoskupín s odlišnými disociačnými konštantami najmä v oblasti pH 2—5. V týchto hraniciach pH primárne fosfátové skupiny sú úplne disociované. Najvhodnejšie sa zdá pH 3,5 pri ktorom stupeň disociácie aminoskupín je u adenylvej kyseliny 0,54, guanylovej 0,05, cytidylvej 0,84 a u uridylovej kyseliny táto disociácia neexistuje. K tomu sa ešte pripája u nukleotidov záporný náboj primárnej fosforečnej skupiny rovný 1. Pri bázach a nukleozidoch prichádza do úvahy len náboj aminoskupiny. Tieto sa potom pohybujú ku katóde v obrátenom poradí ako nukleotidy k anóde (27).

Prvý pokus rozdelenia komponentov nukleových kyselín kyslou elektroforézou uskutočnili Gordon a Reichard (28) na agarovom géle. Mal však rad nevýhod najmä pre zahrievanie gélu. Markham a Smith (29, 30) popísali vhodnejšiu metódu, pri ktorej sa papier chladí ponorením v chloride uhličitom. Prístroj sa skladá z troch sklenených nádob, z ktorých krajné obsahujú tlmivý roztok a prostredná nádoba chlorid uhličitý. Potrebný elektrický zdroj má mať možnosť meniť napätie od 500 do 1000 voltov, aby potenciálny spád bol približne 20 voltov na centimeter. Tlmivé roztoky, ktoré sa používajú majú byť prchavé, aby sa dali z papiera odstrániť, čo je dôležité najmä vtedy, ak sa vzorky potom delia chromatograficky. Pri elektroforéze sa obyčajne používa papier Whatman 3. Detekcia a kvantitatívne stanovenie sa prevádza ako pri delení chromatografiou na papieri.

Delenie chromatografiou na iontomeničoch. Metóda delenia látok na iontomeničoch má oproti chromatografii na papieri výhodu v tom, že sa môže použiť na delenie pomerne veľkého množstva látok pre preparatívne účely. Toto platí ako pre nukleotidy tak pre bázy a nukleozidy. Jej nevýhodou je, že je časovo veľmi náročná, lebo niektorá analýza trvá aj niekoľko dní.

Pri delení sa využíva to, že každá báza má jednu alebo viac disociujúcich skupín, ktoré v príslušných podmienkach disociujú ako kationy alebo anióny. Nadviazanie pentózy na týchto vlastnostiach nič nemení, takže nukleotidy disociujú podobne ako príslušné voľné bázy. Nukleotidy sa značne líšia od báz a nukleozidov a to zásluhou prítomnosti silne disociovaného zvyšku kyseliny fosforečnej, takže nukleotidy disociujú ako aniony, ale ich chovanie je ovplyv-

nené i ostatnými skupinami bázy, pH roztoku neurčuje účinný náboj molekuly, lebo ovplyvňuje stupeň disociácie jednotlivých skupín.

Delenie nukleotidov. Nukleotidy vzhľadom na ich silnú kyslosť delia sa výhradne za použitia bázičských anexov v chloridovom alebo mravčanom cykle. Najčastejšie na anexe Dowex 1 alebo 2 o veľkosti zrna 200—400 mesh. Tiež sa používajú rôzne deriváty celulózy. Pri delení oligonukleotidov a zmesi po enzymatickom štiepení, kde sú prítomné zložky väčšej molekulovej váhy je výhodné použiť menej sieťované ionexy napríklad Dowex 1 X 4 alebo X 2.

Používaný iontomenič sa musí vždy určitým spôsobom pripraviť do potrebného cyklu podľa povahy elučného činidla. Podľa Cohna (31) rozdelenie prečistených ribonukleotidov sa robí zriedenou kyselinou soľnou. Zmes sa adsorbuje zo zriedeného amoniakálneho roztoku tak, aby spoločná koncentrácia chloridov bola menšia ako 0,01 móla. Potom nasleduje premývanie 0,01 molárnym chloridom amonným pokiaľ pH odtiekajúceho roztoku nedosiahne hodnotu 7. Takéto premývanie chloridom amonným odstraňuje prítomný bikarbonát a takým spôsobom predchádza sa tvoreniu kysličníka uhličitého pri práci s kyselinou. Namiesto kyseliny soľnej a jej solí môžu sa použiť tiež iné kyseliny a ich soli a to napríklad mravčan alebo acetát (31, 32), ale iba v tom prípade ak neide o nasledujúce koncentrovanie roztoku druhou adsorpciou a elúciou, pretože kyselina soľná má malú ionovú silu.

Množstvo jednotlivých nukleotidov sa určí potom spektrofotometricky.

Delenie báz a nukleotidov. Delenie báz a nukleotidov prebieha najlepšie na anexe, kde sa využíva disociácia ich kyslých skupín. K eluovaniu týchto zlúčenín z anexu sa používa amoniak v zmesi s chloridom amonným. Elúcia v alkalickom prostredí je výhodná aj preto, že za týchto podmienok je glykozidová väzba nukleotidov stálejšia než pri delení na katexe, kde sa eluuje v prostredí pomerne silne kyslom. K deleniu ribonukleotidov od dezoxiribonukleotidov na anexe sa často využíva tvorby komplexov s boritanmi.

Hydrolýza dezoxiribonukleovej kyseliny pre kvantitatívne stanovenie báz

Purínové a pyridínové komponenty dezoxiribonukleovej kyseliny sa dobre určujú v stave voľných báz, ktoré sa môžu získať s kvantitatívnym výťažkom po uskutočnení príslušnej kyslej hydrolýzy. Výťažky nukleotidov a nukleozidov kyseliny dezoxiribonukleovej neboli uspokojivé tak po kyslej ako aj po zásaditej hydrolýze.

Hydrolýza kyselinou soľnou. Puríny sa dostatočne uvoľňujú z kyseliny dezoxiribonukleovej pri hydrolýze zriedenou kyselinou soľnou, ktorá je charakterizovaná pH 1,6 pri 37 °C za 24 hodín alebo pH 2,8 pri 100 °C za 1 hodinu (33). Silnejšia hydrolýza 6 normálnou kyselinou soľnou pri 120 °C za 2 hodiny (34, 35) dáva dobrý výťažok pyridínov, ale vyvoláva rozrušenie niektorých purínov. Podľa Hersheya a spolupracovníkov (36) možno tomu čiastočne zabrániť ak sa hydrolyzuje vzorka kyseliny dezoxiribonukleovej 6 normálnou kyselinou soľnou pri 100 °C za 3 hodiny v zatavených skúmavkách naplnených kysličníkom uhličitým.

Hydrolýza kyselinou chloristou. Na hydrolýzu dezoxiribo-

nukleovej kyseliny podľa Marshaka a Vogela (37) treba použiť 7,5 normálnu kyselinu chloristú; maximálny výťažok sa dostáva hydrolýzou pri 100 °C za 1 hodinu. Pri tejto hydrolýze sa štiepi malé množstvo tymínu, tiouracil sa mení na uracil a 5-metylcytozín sa rozkladá úplne (38).

Hydrolýza kyselinou mravčou. 1–20 mg dezoxyríbonukleovej kyseliny sa hydrolyzuje s 0,5 ml 88–98 % -nej kyseliny mravej pri 175 °C za 30 minút (39). Bolo zistené, že sa používaním väčších koncentrácií môže výťažok guanínu a oxymetylcytozínu podstatne zvýšiť. Hydrolýza sa uskutočňuje v zatavených ampulkách.

Hydrolýza ribonukleovej kyseliny

Ribozidy sa štiepia ťažšie ako príslušné dezoxiribozidy; stálosť pyridínových ribozidov je taká veľká že sa nedá dosiahnuť kvantitatívny výťažok voľných báz. Napriek tomu sa mononukleotidy ľahšie uvoľňujú z ribonukleovej kyseliny a to umožňuje určiť pyrimidínové a purínové bázy v stave nukleotidov.

Chargaff a spolupracovníci (40) hydrolyzovali ribonukleovú kyselinu na nukleotidy pri pH 13–14 pri 30 °C za 18 hodín. Boulanger a Montreuil (41) používali 0,5 normálny hydroxyd sodný pri teplote 20–22 °C počas 18 hodín a dosiahli pritom dobré výsledky. Pri 37 °C 1 normálny hydroxyd sodný vyvoláva čiastočné rozrušenie cytidylovej kyseliny; 0,3 normálny lúh takéto účinky nevyvoláva (42). Toto potvrdili aj Davidson a Smellie a iní (43, 44), ktorí použili 0,3 normálny hydroxyd draselný pri 37 °C za 18 hodín. Crosbie a spolupracovníci (46) uskutočnili analýzu radu vzoriek ribonukleovej kyseliny ako touto metódou tak aj hydrolýzou v 1 normálnej kyseline soľnej a v koncentrovanej kyseline chloristej s nasledujúcim chromatografickým rozdelením. Alkalická hydrolýza dávala stále vyššie výsledky pre uracil a cytozín a tiež vysoký súčtový výsledok v prepočte na fosfor v porovnaní s inými metódami. Alkalická hydrolýza s nasledujúcim elektroforézovým rozdelením nukleotidov je najspoľahlivejšia metóda rozpracovaná pre mikroanalýzu ribonukleovej kyseliny (46).

Mikrobiologické stanovenie nukleových kyselín

Hoff-Jørgesen (47, 48) prvý vypracoval mikrobiologickú metódu na stanovenie dezoxyríbonukleovej kyseliny, pri ktorej je tymidín výlučným zdrojom pre biosyntézu dezoxiribozidu osobitným kmeňom *Thermobacterium acidophilum* a to tak v inokulu vzorky ako aj pri stanovení kalibračnej krivky. Túto metódu ešte zdokonalili Løvrup a Ross (49). Aplikácia mikrobiologických metodík predpokladá mať k dispozícii nielen osobitný testovací kmeň, ale aj čisté chemikálie, menovite tymidín, dezoxycytidín, dezoxyadenozín, dezoxyguanozín, z ktorých sa skladá definované rastové médium.

Súhrn

Stručný prehľad najpoužívanějších metód na extrakciu, preparáciu, rozdelenie a stanovenie nukleových kyselín a ich jednotlivých zložiek.

Literatúra

1. Daly M. M., Allfrey G., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., 33, 497, 1950.
2. Kerr S. E., Seraidarian K., Wargon M., J. Biol. Chem., 181, 761, 1949.
3. Schmidt G., Thannhauser S. J., J. Biol. Chem., 161, 83, 1945.
4. Ogur M., Rosen G., Arch. Biochem., 25, 262, 1950.
5. Schneider W. C., J. Biol. Chem., 161, 293, 1945.
6. Mitchell P., Moyle J., J. Gen. Microbiol., 5, 966, 1951.
7. Steven F. A., West R., J. Exptl. Med., 35, 823, 1922.
8. Bonnar R. A., Duggan E. L., J. Biol. Chem., 212, 697, 1955.
9. Fiske C. H., Subbarow Y., J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
10. Schneider W. C., Hogeboom G. H., Ross H. E., Natl. Cancer Inst., 10, 977, 1950.
11. Dische Z., Mikrochemie, 8, 4, 1930.
12. Webb J. M., Levy H. B., J. Biol. Chem., 213, 107, 1955.
13. Dische Z., Biochem. Z., 204, 431, 1929.
14. Mejbbaum W., Z. Physiol. Chem., 258, 117, 1939.
15. Euler H., Hahn L., Svensk Kem. Tidskr., 59, 251, 1946.
16. Barrenscheen H. K., Pehan A., Z. Physiol. Chem., 272, 81, 1941.
17. Webb J. M., J. Biol. Chem., 221, 635, 1956.
18. Stimson M. M., Reuter M. A., J. Am. Chem. Soc., 67, 847, 1945.
19. Chargaff E., Zamenhof S., J. Biol. Chem., 173, 327, 1948.
20. Magasanik B., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, 7, 396, 1951.
21. Canev R. G., Markov G. G., Biochimija, T 25, 151, 1960.
22. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., 168, 781, 1947.
23. Hotchkiss R. D., J. Biol. Chem. 175, 315, 1948.
24. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., 176, 703, 1948.
25. Reguera R. M., Asimov J., J. Am. Chem. Soc., 72, 5781, 1950.
26. Michl H., Naturwissenschaften, 40, 390, 1953.
27. Dimroth K., Jaenicke L., Vollbrechtshausen T., Z. Physiol. Chem., 289, 71, 1952.
28. Gordon A. H., Reichard T., Biochem. J., 48, 569, 1951.
29. Markham R., Smith J. D., Nature, 168, 406, 1951.
30. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., 52, 552, 1952.
31. Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 72, 1471, 2811, 1950.
32. Busch H., Hurlbert R. B., Potter V. R., J. Biol. Chem., 196, 717, 1952.
33. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., J. Biol. Chem. 195, 49, 1952.
34. Daly M. M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., 33, 497, 1950.
35. Gold M. N. I., Sturgis S. H., J. Biol. Chem., 196, 143, 1952.
36. Hershey A. D., Dixon J., Chase M., J. Gen. Physiol., 36, 777, 1953.
37. Marshak A., Vogel H., J. Biol. Chem., 189, 597, 1951.
38. Wyatt G. R., J. Gen. Physiol., 36, 201, 1952.
39. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., 176, 715, 1948.
40. Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green C., Doniger R., Elson D., J. Biol. Chem., 186, 51, 1950.
41. Boulanger P., Montreuil J., Bull. Soc. Chim. Biol., 33, 784, 791, 1951.
42. Marrian D. H., Spicer V. L., Balis M. E., Brown G. B., J. Biol. Chem., 189, 533, 1951.
43. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Biochem. J., 52, 594, 1952.
44. Jevreinová T. N., Maslova S. V., Jermochina T. M., Sizová T. P., Mikrobiologija, T 29, 516, 1960.
45. Crosbie G. W., Smellie R. M., S., Davidson J. N., Biochem. J., 54, 287, 1953.
46. Chargaff E., Davidson J. N., The Nucleic Acids, Academic Press, New York 1955.
47. Hoff-Jørgensen E., Biochem. J., 50, 400, 1951.
48. Hoff-Jørgensen E., Recent developments in cell physiology, Academic Press, New York 1954.
49. Løvtrup S., Roos K., J. Bacteriol. 78, 114, 1959.

Методы разделения и количественного определения нуклеиновых кислот

Резюме

Краткий обзор наиболее употребляемых методов для экстракции, препарации, разделения и определения нуклеиновых кислот и их отдельных составных частей.

Methoden der Teilung und der quantitativer Bestimmung von Nucleinsäuren

Zusammenfassung

Kurzgefasste Übersicht der Methoden, die für die Extraktion, Vorbereitung, Verteilung und Bestimmung der Nucleinsäuren und ihrer einzelner Bestandteile am meisten angewendet werden.