

# Biochemisches Grundpraktikum

Versuch Nummer G-10:

Eigenschaften von Nukleinsäuren

**Gliederung:**

<b>I. Hydrolyse der Nucleinsäuren.....</b>	<b>2</b>
a) Durchführung .....	2
b) Beobachtungen.....	2
c) Auswertung .....	2
<b>II. Nachweis der Bestandteile (Purine, Phosphat, Ribose, Desoxyribose).....</b>	<b>2</b>
a) Durchführung .....	2
b) Beobachtungen.....	2
c) Auswertung und Diskussion .....	2
<b>III. Bestimmung der Löslichkeit von DNA .....</b>	<b>4</b>
a) Durchführung .....	4
b) Beobachtungen.....	4
c) Auswertung und Diskussion .....	4
<b>IV. Untersuchung auf Interkalation.....</b>	<b>4</b>
a) Durchführung .....	4
b) Beobachtungen.....	4
c) Auswertung und Diskussion .....	4
<b>V. Bestimmung der Viskosität von DNA-Lösungen.....</b>	<b>5</b>
a) Durchführung .....	5
b) Beobachtungen.....	5
c) Meßwerte .....	5
d) Auswertung und Diskussion .....	5
<b>VI. Messung der Hyperchromie .....</b>	<b>6</b>
a) Durchführung .....	6
b) Meßwerte.....	6
c) Auswertung und Diskussion .....	7
<b>VII. Ergänzungen.....</b>	<b>8</b>
a) Nachweis von Desoxyribose .....	8

## I. Hydrolyse der Nukleinsäuren

### a) Durchführung

Von den ausstehenden DNA- und RNA-Lösungen (5 g/l) werden je 1 ml mit 0.5 ml konz. Schwefelsäure versetzt und für 30 min bei 100° C im Wasserbad erhitzt.

### b) Beobachtungen

Zuerst bildet sich ein weißer Niederschlag, der gelb wird und sich später auflöst. Nach der Hydrolyse ist die Lösung gelb und klar.

### c) Auswertung

Während die Pyrimidinnukleotide durch die saure Hydrolyse nicht verändert werden, werden die Purinbasen in ihre Bestandteile (Base, Zucker und Phosphat) gespalten.

## II. Nachweis der Bestandteile (Purine, Phosphat, Ribose, Desoxyribose)

### a) Durchführung

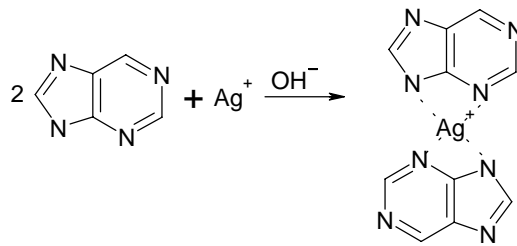
- Purine: Von dem unter a) hergestellten Hydrolysat wird je 1 ml mit 25%iger Ammoniaklösung neutralisiert und mit etwas ammoniakalischer Silbernitratlösung (steht aus) versetzt.
- Phosphat: Je einem ml des Hydrolysats wird eine Spatelspitze festes Ammoniumheptamolybdat zugefügt. Nachdem die Beobachtungen notiert worden sind, werden 1-2 Körnchen Eisen(II)-Sulfat zugegeben.
- Ribose: Je 1 ml Natrium-RNA- und Natrium-DNA-Lösung (5 g/l) sowie ein Kontrollansatz mit 1 ml H<sub>2</sub>O werden mit 2 ml der fertigen Orcin-Lösung versetzt und für 10 min in das Wasserbad gestellt (100° C).
- Desoxyribose: Je 1 ml RNA- und DNA-Lösung (5 g/l) sowie ein Kontrollansatz mit 1 ml H<sub>2</sub>O werden mit 2 ml des fertigen DISCHE-Reagenz versetzt und für 10 min bei 100° C im Wasserbad erhitzt.

### b) Beobachtungen

- Purinnachweis: Beide Lösungen (RNA und DNA) bilden weiße Schlieren.
- Phosphatnachweis: Zuerst wurden die Lösungen gelb, nach der Eisen(II)-Sulfat-Zugabe färbt sich die RNA-Lösung blau, die DNA-Lösung blaugrün.
- Ribosenachweis: Die Lösung der DNA ist gelblich-grün und trüb, bei der RNA-Lösung bildet sich ein dunkelgrüner Niederschlag in Form von Punkten. Die Kontrollprobe ist leicht gelb und klar.
- Desoxyribosenachweis: Während bei der Kontrolllösung und der RNA keine Veränderung zu beobachten ist, zeigt die DNA-Lösung eine starke dunkelblaue (fast schwarze) Färbung

### c) Auswertung und Diskussion

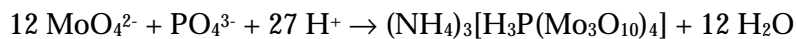
- Purine: Durch die Zugabe von Silberionen (in Form von Silbernitrat) bilden sich Komplexe mit den freien Purinbasen (Abbildung II-1, nächste Seite). Diese Komplexe sind für die weißen Schlieren verantwortlich.



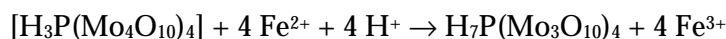
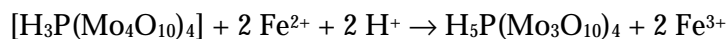
**Abbildung II-1:** Nachweis von Purinen

Durch die aufgetretene weiße Färbung ist der Nachweis der Purine positiv.

- Phosphat: Die Phosphationen bilden mit dem Molybdat in saurer Lösung gelbe (Triammonium)-Dodecamolybdatphosphorsäure:

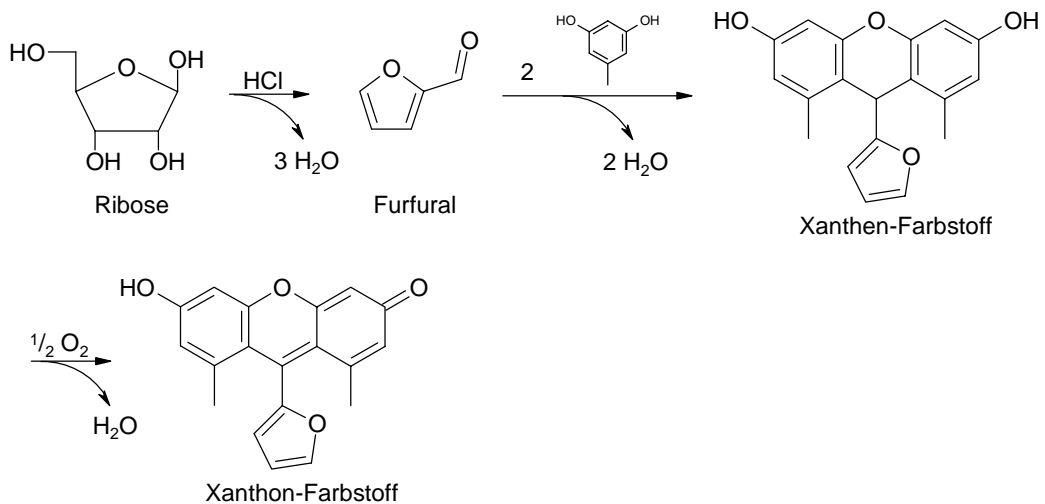


Diese Polysäure kann mit starken Reduktionsmitteln wie bspw. Fe(II) zu Phosphormolybdänblau reduziert werden. Die starke Färbung kommt durch die Anwesenheit von Mo(VI) und Mo(V) zustande:



Bei beiden Lösungen sind die Färbungen zu erkennen, was auf die Anwesenheit von Phosphat schließen läßt.

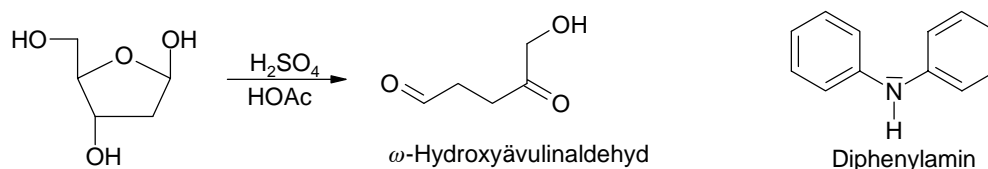
- Ribose: Bei der Zugabe von Salzsäure und Orcin finden folgende Reaktionen statt:



Die Färbung der Lösungen ist bedingt durch die Farbstoffe.

Wie erwartet findet bei der RNA-Lösung eine starke Färbung statt, da sie Ribose in großen Mengen enthält. Die Farbe bei der DNA-Lösung kommt durch eventuelle Verunreinigungen oder oxidierte Desoxyribose zustande.

- Desoxyribose: Die Bestandteile des DISCHE-Reagenzes sind Diphenylamin, konzentrierte Schwefelsäure und Eisessig. Eisessig und Schwefelsäure bewirken die Ringöffnung der Desoxyribose und Oxidation zu  $\omega$ -Hydroxyävalinaldehyd (siehe auch Seite 8):



Dieser Aldehyd bewirkt zusammen mit Diphenylamin die blaue Farbe der DNA-Lösung. Da die Pentose der RNA eine Ribose ist, zeigt die Lösung keine Färbung.

### III. Bestimmung der Löslichkeit von DNA

#### a) Durchführung

Einem Milliliter der DNA-Lösung (5 g/l) wird tropfenweise 1 M HCl zugefügt und die Beobachtungen notiert. Anschließend wird 1 M NaOH zugetropft.

#### b) Beobachtungen

Nach Zugabe von zwei Tropfen Salzsäure beginnt eine Trübung, beim dritten Tropfen ist die Lösung milchig-trüb. Durch das Zutropfen von Natronlauge verschwindet die Trübung in demselben Maße.

#### c) Auswertung und Diskussion

Bei DNA handelt es sich aufgrund der Phosphatgruppen um ein Polyanion. Wird die Protonenkonzentration der Lösung erhöht, werden die Phosphatgruppen protoniert. Es verschwindet die negative Ladung und die Abstoßung fehlt, wodurch sich die einzelnen Stränge zusammenlagern können. Daraus resultiert die Ausfällung der DNA als weiße Schlieren.

### IV. Untersuchung auf Interkalation

#### a) Durchführung

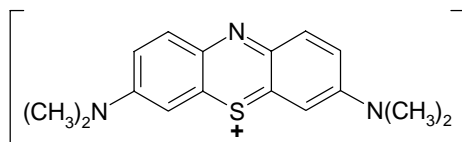
Je 0.2 ml Natrium-RNA- und Natrium-DNA-Lösung (5 g/l) sowie hochmolekularer Kalbsthymus-DNA-Lösung (DNA II) werden 0.8 ml H<sub>2</sub>O zugefügt und mit 2 ml Essigsäure angesäuert. Danach gibt man 0.03 ml Methylenblau (1 g/l) hinzu.

#### b) Beobachtungen

Bei jeder der drei Lösungen findet eine Blaufärbung statt. Bei der hochmolekularen DNA bildet sich zusätzlich ein dunkelblauer Strang. Die Intensität der Blaufärbung ist bei der RNA-Lösung etwas höher als bei der DNA-Lösung.

#### c) Auswertung und Diskussion

Unter dem Begriff *Interkalation* (speziell in der Biochemie) versteht man die Einschlebung von Molekülen wie diversen Farbstoffen oder Antibiotika in die Doppelhelix der DNA. Diese geschieht derart, daß Replikation und Translation nicht mehr möglich sind.



**Abbildung IV-1:** Methylenblau

Bei Methylenblau (Abbildung IV-1) handelt es sich um ein solches Molekül; es lagert sich zwischen die Basen eines Nukleinsäure-Doppelstranges.

Diese Interkalation wird durch den blauen Strang in der hochmolekularen DNA-Lösung sehr deutlich. Die unterschiedlichen Intensitäten der Lösungen sind durch den Einbau der Farbstoffmoleküle in die Doppelstränge zu erklären, da dadurch das Absorptionsverhalten geändert wird. Aufgrund des höheren Doppelstrangcharakters der DNA ist hier die Färbung etwas geringer, während die RNA nur teilweise Basenpaare ausbildet und deshalb nicht so viele Farbstoffmoleküle „binden“ kann.

## V. Bestimmung der Viskosität von DNA-Lösungen

### a) Durchführung

Einem Milliliter der hochmolekularen Kalbsthymus-DNA-Lösung (5 g/l DNA II in 0.5 M Acetatpuffer mit 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 5.5) werden 0.5 ml des 0.5 M Acetatpuffers und ein Tropfen Methylenblau zugesetzt. Zuerst wird allerdings die Viskosität des reinen Puffers bestimmt, indem die Auslaufzeit der Lösung aus einer 0.2-ml-Pipette über eine Strecke von 15 cm (wir nahmen 13.5 cm) gemessen wird. Die Pipetten sollte für eine konstante Geschwindigkeit gleichmäßig in die Lösung eintauchen. Danach bestimmt man auf gleiche Weise die Viskosität der angesetzten DNA-Lösung.

In einem weiteren Ansatz werden der DNA-Lösung 0.03 ml DNase-Lösung zugefügt und zunächst nach zwei Minuten, dann alle drei bzw. fünf Minuten die Auslaufzeit gemessen, bis diese konstant ist.

### b) Beobachtungen

Die Pufferlösung läuft sehr schnell aus, während die DNA-Lösung anfangs sehr langsam ausfließt. Mit zunehmender Einwirkzeit der DNase erhöht sich die Auslaufgeschwindigkeit.

### c) Meßwerte

In Tabelle V-1 sind die gemessenen Zeiten eingetragen.

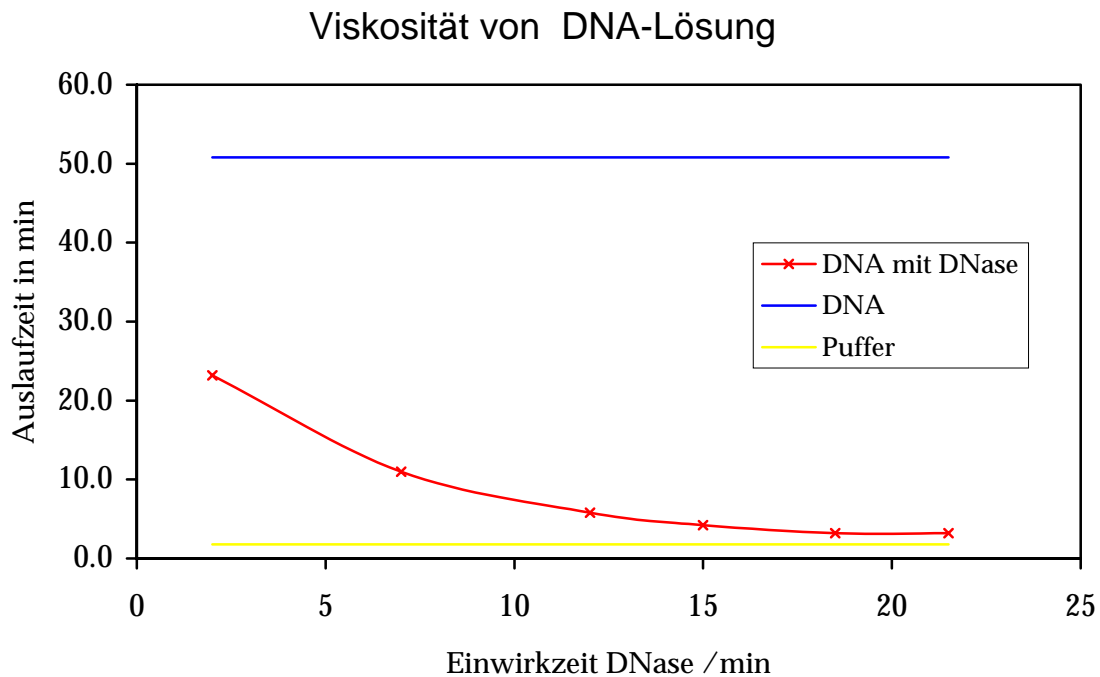
Lösung	Auslaufzeit	Einwirkzeit	Auslaufzeit
	in s	in min	in s
DNA	50.8	2	23.2
	50.8	7	11.0
	50.4	12	5.8
Mittelwert	50.8	15	4.2
Puffer	1.8	18.5	3.2
	1.6	21.5	3.2
	1.6		
Mittelwert	1.8		

**Tabelle V-1** : Auslaufgeschwindigkeiten

### d) Auswertung und Diskussion

Die in Tabelle V-1 eingetragenen Werte sind in Diagramm V-1 (nächste Seite) graphisch aufgetragen.

Begründet liegt die Abnahme in der Wirkungsweise der DNase: Sie spaltet die Phosphodiesterbindungen zwischen den einzelnen Nukleotiden. Die Bruchstücke der DNA weisen eine weitaus geringere Viskosität als das helikale Gesamtmolekül auf. Nach einer gewissen Zeit ist eine minimale Viskosität erreicht, weil die DNase sämtliche DNA fragmentiert hat. Die Wirkung kann auch durch die Veränderung der Absorption der DNA-Lösung verfolgt werden (siehe Messung der Hyperchromie, Seite 6).



**Diagramm V-1:** Abhängigkeit der Viskosität von der DNase-Aktivität

## VI. Messung der Hyperchromie

### a) Durchführung

In einem Photometer wird bei 260 nm mit 0.5 M Acetatpuffer kalibriert, dann die Extinktion von 1 ml der hochmolekularen Kalbsthymus-DNA-Lösung (0.05 g/l DNA II in 0.5 M Acetatpuffer mit 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 5.5) gemessen. Anschließend gibt man 0.03 ml der DNase-Lösung zu und mißt jede Minute, nach einer Viertelstunde alle drei Minuten die Extinktion.

### b) Meßwerte

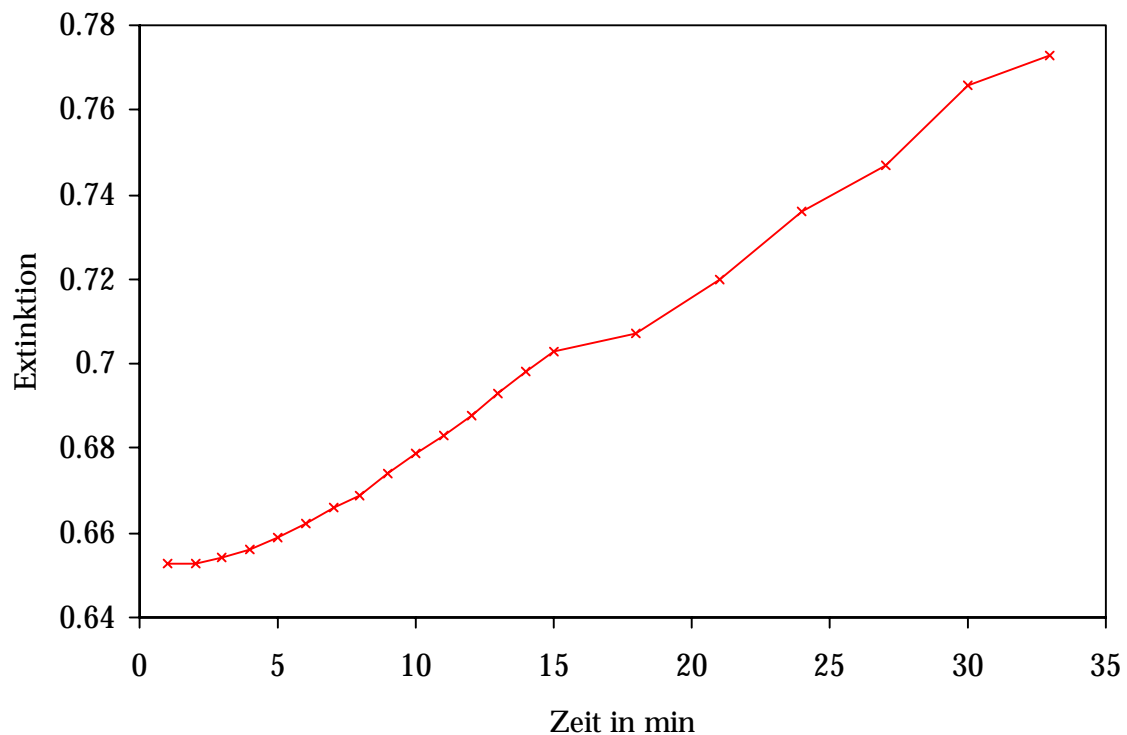
Tabelle VI-1 enthält die Meßwerte der Extinktionen in Abhängigkeit der Einwirkzeit.

Zeit / min	Extinktion	Zeit / min	Extinktion
1	0.653	12	0.688
2	0.653	13	0.693
3	0.654	14	0.698
4	0.656	15	0.703
5	0.659	18	0.707
6	0.662	21	0.720
7	0.666	24	0.736
8	0.669	27	0.747
9	0.674	30	0.766
10	0.679	33	0.773
11	0.683		

**Tabelle VI-1:** Extinktionen

## c) Auswertung und Diskussion

In Diagramm VI-1 ist deutlich die ansteigende Extinktion zu erkennen.



**Diagramm VI-1:** Extinktionsänderung der DNA-Lösung in Abhängigkeit der DNase-Einwirkzeit

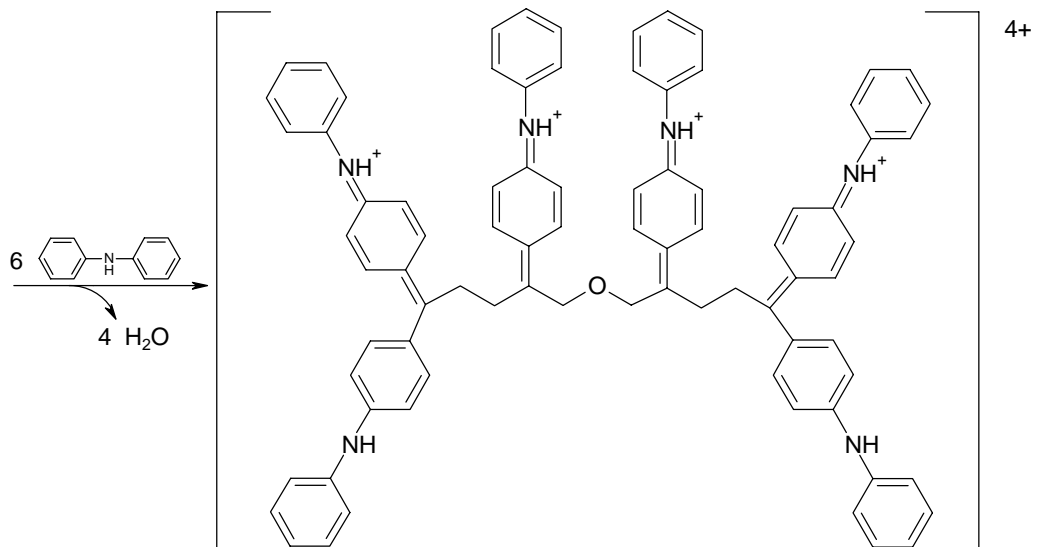
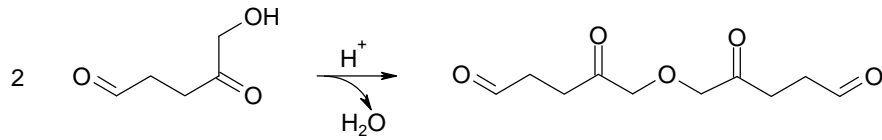
Extinktionsrelevant sind bei der untersuchten Wellenlänge (260 nm) die  $\pi$ -Elektronen der Nukleotidbasen. Wie schon zuvor erwähnt, spaltet die DNase die DNA in ihre Nukleotide. Während in der nativen DNA die Basen durch Paarung und versetzte Stapelung sich gegenseitig in ihren Elektronenverteilungen beeinflussen, zeigen die einzelnen Nukleotide kaum Wechselwirkungen untereinander. Folge ist, daß das konjugierte System der nativen DNA längerwelligeres Licht absorbiert. Eine Zunahme der Extinktion im UV-Bereich bedeutet demnach eine Zunahme von freien Nukleotiden. Die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge bezeichnet man als *Hyperchromie*.

Die Zunahme der Extinktion beträgt 18%. Der ungewöhnliche Verlauf der Kurve am Anfang sowie die geringe Änderung ist dadurch bedingt, daß die DNase direkt aus dem Kühlschrank kam. Durch die höhere Temperatur der DNA-Lösung steigt die DNase-Aktivität zunächst an. Zum Ende der Messung steigt die Kurve langsamer, da fast alle Nukleotide frei in Lösung sind. Allerdings wurde aus zeitlichen Gründen die Messung vorzeitig beendet, so daß der Verlauf nicht ganz wie erwartet ausfiel.

## VII. Ergänzungen

### a) Nachweis von Desoxyribose

Die auf Seite 3 angegebene Nachweisreaktion lautet vollständig:



Der vierfach positiv geladene Komplex ist für die Färbung verantwortlich.