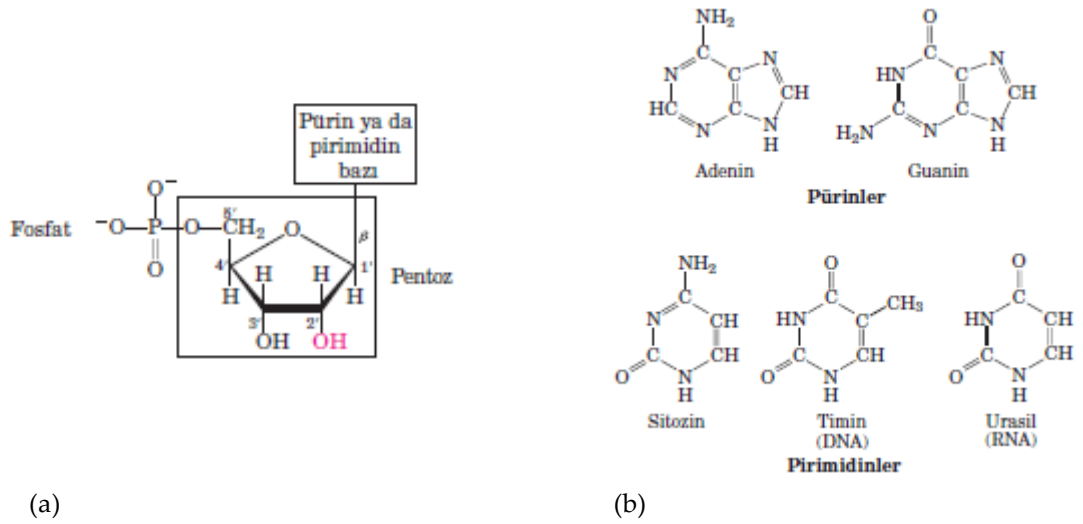


## NÜKLEİK ASİTLER

Nükleotitler, nükleik asitlerin yapı taşlarıdır. Nükleotitlerin, hücre metabolizmasında çeşitli görevleri vardır. Nükleotitler, metabolik dönüşümlerde enerji birimi, hücrelerin hormonlara ve diğer hücre dışı uyarılara verdiği yanıtta aracı temel moleküllerin ve bir dizi enzimin kofaktörleri olup, ayrıca metabolik ara bileşiklerin de yapısal bileşenidirler. Son ama önemli bir işlevleri de, genetik bilginin kaynağı olan nükleik asitlerin; deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asidin (RNA) bileşeni olmalarıdır.

**Nükleotitler** üç tipik bileşenden oluşurlar: (1) azot içeren bir baz, (2) bir pentoz, ve (3) bir fosfat. Fosfat grubunu içermeyen molekül **nükleosit** olarak adlandırılır. Azotlu bazlar iki ana bileşik, **pürin** ve **pirimidin** türevleridirler.



Şekil 1. (a) Nükleotit yapısı. (b) Pürin ve pirimidin bazları

Nükleik asitler, adenin ve guanin (pürin) ile sitozin, timin ve urasil (pirimidin) bazlarını içerirler. Pirimidin bazlarından timin yalnızca DNA'da, urasil yalnızca RNA'da bulunurken sitozin her ikisinde de bulunmaktadır.

DNA ve RNA'daki ardışık nükleotitler kovalent olarak fosfat grubu 'köprüleriyle' bağlıdır. Bir nükleotidin 5'-fosfat grubu diğer nükleotidin 3'-hidroksil grubuna bağlanarak **fosfodiester bağı**nı oluşturur. Nükleik asitlerin omurgaları fosfat ve

pentozun tekrarları şeklindedir ve azotlu bazlar omurgaya belirli aralıklarla tutunmuş yan gruplar gibi düşünülebilir.

Pürin ve pirimidin bazları hücrenin nötrale yakın pH'ında oldukça hidrofobiktirler ve suda çözünmezler. Asidik veya alkali pH'da bazlar yüklü hale geçer ve suda çözünürlükleri artar. Pirimidinlerin ve pürinlerin işlevsel grupları, halkadaki azotlar, karbonil grupları ve halka dışı amino gruplarıdır. Amino ve karboksil grupları arasındaki hidrojen bağları nükleik asidin iki zinciri (nadir olarak üç veya dört) arasındaki en önemli etkileşim yoludur. En sık görülen, A'nın özgül olarak T (veya U) ile, G'nin de C ile bağlandığı hidrojen bağı kurma kalıbı James D. Watson ve Francis Crick tarafından 1953'de tanımlanmış olandır.

Oluşan baz eşleşmeleri sonrasında iki DNA iplikçisi bir dönüşte 10 baz çifti bulunduracak şekilde birbirine vida biçiminde sarılırlar böylece uzayda üç boyutlu DNA yapısı oluşur. Oluşan hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler çift sarmalın termodinamik kararlılığını sağlar.

### **Denatürasyon**

Özenle ayrıştırılmış doğal DNA çözeltileri oda sıcaklığında (25°C) ve pH 7,0'de oldukça viskozdur. Böyle bir çözeltinin pH'sında aşırı bir değişim ve sıcaklığında 80°C'nin üstünde olacak şekilde değişiklik yapıldığında DNA'nın, fiziksel bir değişime uğradığının göstergesi olarak, viskozitesi hızla azalır. Sıcaklık ve uç pH değerleri, globüler proteinleri bozdukları gibi, çift sarmal DNA'nın denatürasyonuna veya erimesine de neden olurlar. Eşleşmiş bazlar ve baz istifleri arasındaki hidrojen bağlarının kopması, molekülün tamamı veya bir kısmı (kısmi denatürasyon) boyunca, iki ipliği birbirinden uzunlamasına ayrılacak şekilde sarmalın açılmasına neden olur. DNA'da kovalent bağlar kırılmaz.

Nükleik asitteki istiflenmiş bazlar arasındaki sıkı etkileşimler aynı miktarda serbest nükleotit içeren çözeltininkine oranla UV soğurmasında azalmaya yol açar. İki iplik eşleştiğinde de soğurma azalır. Buna **hipokromik etki** denir. Çift sarmallı nükleik asidin çözülmesi de ters yönde etki eder: soğurmada artış **hiperkromik etki** olarak

bilinir. Dolayısıyla çift sarmaldan tek zincirli, denatüre olmuş yapıya geçiş 260 nm’de UV soğurulması incelenerek izlenebilir.

Her DNA tipinin kendine özgü bir denatürasyon sıcaklığı, **çözüşme (erime) noktası** ( $t_m$ , DNA parçasının yarısının çözülmüş olduğu sıcaklık) vardır: G,C çiftlerinin içeriği arttıkça DNA’nın erime sıcaklığı artar. Bunun nedeni G,C baz çiftlerinin içerdikleri üç hidrojen bağı nedeniyle A=T baz çiftlerine göre denatürasyonu için daha fazla ısı enerjisine gerek duymalarıdır.

## **Deneysel Çalışmalar**

### **Nükleik Asitlerin Kalitatif Tayini**

#### **Deney 1. Pürinlerin Kalitatif tayini**

**Deneyin prensibi:** Pürin bazlarının gümüş tuzları ile çözünmeyen beyazımsı tuzlar oluşturması esasına dayanır.

**Deneyin yapılışı:** 1 mL kas hidrolizati alınır ve içerisine küçük bir parça turnusol kağıdı atılır. Turnusol kağıdının rengi mavi olana kadar amonyak ilave edilir. Üzerine 1-2 mL %2.6 gümüş nitrat ilave edilir. Oluşan beyazımsı çökelek pürinlerin varlığını gösterir.

#### **Deney 2. Pentozların Kalitatif Tayini İçin Bial Testi**

**Deneyin prensibi:** Kas hidrolizatında bulunan riboz der. HCl ile ısıtıldığı zaman oluşan furfuraller demir iyonlarının varlığında orsinol ile mavi-yeşil kondenzasyon ürünü oluştururlar.

**Deneyin yapılışı:** 1 mL kas hidrolizati çözeltisine 3 mL Bial ayırıcı eklenerek karıştırılır ve su banyosunda kaynatılır. Sonuçta yeşil renkli bir çözelti gözlenir.

#### **Deney 3. Fosfatların Kalitatif Tayini**

**Deneyin prensibi:** Fosfat iyonlarının amonyum molibdat ile sarı renkli amonyum fosfomolibdat çökeleğini vermesi esasına dayanır.

**Deneyin yapılışı:** Kas hidrolizatından 1 mL alınıp üzerine 1 mL amonyum molibdat (%5) ilave edilir. Oluşan sarı çökelek fosfat iyonlarının varlığını gösterir.

## Nükleik Asitlerin Kantitatif Tayini

### Deney 4. Difenilamin Metodu ile DNA Tayini

**Deneyin prensibi:** DNA'nın kuvvetli bir asitle muamele edilmesi sonucunda şeker-fosfat iskeleti kopar ve ortaya çıkan deoksiriboz dehidrasyona uğrayarak  $\omega$ -hidroksilevunil aldehit meydana gelir. Oluşan aldehidin difenil amin ile kondense bileşikler oluşturması esasına dayanır.

#### Deneyin yapılışı:

Çözeltiler (mL)	Kör	Örnek	Std.1 DNA	Std.2 DNA	Std.3 DNA
Standart DNA	-	-	0.2	0.4	0.8
Kas Hidrolizati	-	1.6	-	-	-
1N PCA	2	0.4	1.8	1.6	1.2
B Reaktifi	4	4	4	4	4

Tüpler 10 dk su banyosunda kaynatılır. Bu sürenin sonunda soğutularak 600 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılır.

#### Çözeltiler

**Standart DNA çözeltisi:** 50 mg DNA + 100 mL PCA içerisine kaynatılarak çözülür.

**Kas hidrolizati:** 1 g kas 20 mL 1 N PCA içerisinde kaynatılır ve süzülür. Süzüntü deneylerde kullanılacak kas hidrolizatıdır.

**B Reaktifi:** 1.5 g difenilamin, 100 mL der. asetik asit, 1.5 mL der.  $H_2SO_4$  ve 0.5 mL sulu asetaldehit (16 mg/mL) içerisinde çözülmesi ile hazırlanır.

### Deney 5. Bezelye DNA'sının Saflaştırılması

**Deneyin yapılışı:** Ayıklanmış ve buzdolabında soğutulmuş olan bezelyelerden bir mezür yardımıyla 30 mL kadar alınır, bir havana konarak iyice ezilir ve üzerine 30 mL soğuk su ilave edilir, oluşan çözelti tülbent yardımı ile bir behere süzülür. Süzüntüye 10

mL sıvı deterjan eklenerek karıştırılır. Tüplere bu çözeltilerden 3 mL ilave edilir ve üzerine 1-2 damla lens solüsyonu ve 3 mL soğuk alkol (%70 etanol) yavaşca eklenir. 30-60 dakika sonra tüplerde beyaz bulutumsu yapılar bezelyeden elde edilen DNA'lara aittir.

#### **KAYNAKLAR**

(1) Lehninger 2013.

(2) Öztop, H.N. ve Candan, F. Biyokimya Laboratuvarı, Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, Sivas.

(3) [www.uni-regensburg.de/Grafik/d\\_rib2.gif](http://www.uni-regensburg.de/Grafik/d_rib2.gif), Keusch P. Nachweis der Desoxyribose in DNA.