

[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](#)

Wybrane metody oznaczania zawartości kwasów nukleinowych cz. I

Zastosowanie do oznaczania kwasów nukleinowych metod chemicznych, opiera się na określeniu ilości jednego ze składników wchodzących w skład kwasu nukleinowego. Tak więc wśród badanych i oznaczanych składników znajdują się albo kwas fosforowy, albo ryboza (w przypadku RNA lub deoksyryboza- gdy pracujemy na DNA) oraz zasady azotowe. Dokładność z jaką uda się określić zawartość danego składnika zależy głównie od czułości zastosowanej metody analitycznej, a także od zawartości procentowej poszczególnych składników w kwasach nukleinowych [9].



Słowa kluczowe: *absorbancja, stężenie kwasów nukleinowych, żel agarozowy, rozdzielanie elektroforetyczne, pomiar spektrofotometryczny, czipowa technika Bioanalyzer 2100*

Po wyizolowaniu kwasów nukleinowych tj. DNA lub RNA, jednym z pierwszych etapów jaki się wykonuje jest określenie ich czystości i stężenia. Zarówno stężenie DNA jak i RNA można określić dwoma sposobami. Pierwszym z nich może być pomiar absorpcji światła UV przez wyizolowane materiały. Z kolei druga metoda opiera się na wybarwieniu preparatu bromkiem etydyny, następnie wykonaniu elektroforezy w żelu agarozowym, a na końcu porównanie fluorescencji preparatu z preparatem o znanym stężeniu [8].

Preparaty do pomiaru absorbancji muszą być wcześniej rozcieńczone (najczęściej 100 x H₂O lub buforem TE). Oznaczenie wykonuje się za pomocą pomiaru fluorescencji (spektrofotometrem), przy czym należy pamiętać, aby do kalibracji spektrofotometru użyć tego samego buforu, w którym wcześniej rozcieńczono preparaty. Następnie po kalibracji spektrofotometru odczytuje się punktowo wartość absorpcji przy 260, 280 i 320 nm, bądź też można wykonać widmo pomiarów w zakresie od 200 do 350 nm. Wśród najczęściej stosowanych znajdują się spektrofotometry typu NanoDrop. Charakteryzują się one znacznie skróconą drogą optyczną, jednocześnie przy zachowaniu bardzo dużej dokładności pomiarów. Urządzenia tego typu są bardzo przydatne do pomiarów stężenia DNA i RNA, w momencie kiedy dysponuje się unikatowym materiałem wyjściowym (niewielkie jego ilości) [8].

Przyjęło się, że absorbancja przy 260 nm jest równa 1 dla dwuniciowego DNA (dsDNA) o stężeniu 50 µg/ml, dla jednoniciowego DNA o stężeniu 33 µg/ml, oraz dla RNA o stężeniu równym 40 µg/ml. Różna złożoność struktury DNA i RNA powoduje różnice w absorbancji. W związku z tym jednoniciowe kwasy nukleinowe absorbują więcej światła [8].

Mierząc stężenie kwasów nukleinowych przy długości fali równej 260 i 280 nm, możliwe jest jednoczesne określenie ich czystości. Otóż, stosunek wartości absorpcji A₂₆₀ do A₂₈₀ świadczy o zanieczyszczeniu preparatów białkami. Wartość tego współczynnika między 1.8-2.0 oznacza, że wyizolowane preparaty są wystarczająco oczyszczone, z kolei wartość równa 1.5 świadczy o tym, że w danym preparacie kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) jest 50% białka, w związku z czym preparat taki wymaga dodatkowego oczyszczenia [8].

Należy mieć na uwadze fakt, że na ustalenie stężenia DNA lub RNA ma wpływ obecność w preparacie innych substancji, dlatego też zaleca się, aby wykonywać odczyt stężeń przy kilku długościach fali.

Tabela: Substancje absorbujące i charakterystyczne dla nich długości fali [8].

Długość fali (nm)	Substancje absorbujące
230	EDTA, polisacharydy, etanol
260	DNA, RNA
270	Fenol
280	Białka
320	Drobiny komórkowe

Inna często stosowaną metodą oceny ilościowej preparatów kwasów nukleinowych jest porównanie po elektroforezie w żelu agarozowym z preparatem o znanym stężeniu. Metoda ta zaliczana jest do metod z wyboru- w przypadku gdy dysponujemy bardzo małymi ilościami objętościami preparatów DNA. Dzięki zastosowaniu rozdziału DNA w żelu agarozowym, możliwe jest dodatkowo określenie jakości preparatu [8].

W celu sprawdzenia zarówno jakości, jak i ilości preparatu DNA należy przygotować 0,8% żel agarozowy, zawierający 0,5 µ/ml bromku etydyny w buforze 1 x TBE (tj. 10 x TBE: 0,89 M Tris, 0,89 M kwas borowy, 0,02 M EDTA, pH=8.0), następnie nakłada się 0,5; 1,0; oraz 5,0 µg preparatu o znanym stężeniu, oraz preparaty do oszacowania (w buforze obciążającym). Następnie po przeprowadzonej elektroforezie, ilość i jakość preparatów ocenia się na trans iluminatorze, który emituje światło o długości 312 nm. Jeżeli w porównaniu do markera, wielość wyizolowanego DNA migruje w postaci wartego prążka o wielkości ponad 50 kpb, bez widocznych smug, o oznacza to, że wyizolowane DNA jest wysokocząsteczkowe [4], [8].

Metody pomiaru jakości RNA

Cząsteczka RNA odgrywa kluczową rolę w przekazywaniu informacji zakodowanych w genomie (DNA) do różnych form białka. Po ekstrakcji RNA z komórek za pomocą różnych metod, możliwy jest bezpośredni pomiar aktywności komórkowej, wykorzystując w tym celu różne techniki pomiaru ekspresji genów. Tak więc wśród tych metod wyróżnia się m.in. Real-Time PCR, czy mikromacierze DNA (są to aktualnie najczęściej stosowane techniki) [2].

RNA jest termodynamicznie stabilną cząsteczką, która jest jednak bardzo szybko trawiona przez niemal wszechobecne enzymy RNazy. W celu oceny stopnia degradacji RNA przez enzymy stosuje się metody elektroforetyczne, które polegają na separowaniu próbek według wielkości występujących w nich fragmentów kwasów nukleinowych. Zazwyczaj integralność RNA oceniana jest za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, wybarwionym bromkiem etydyny, co powoduje uwidocznienie w żelu pewnych pasmowych wzorów (tzw. prążków). Zazwyczaj na zdjęciach żeli widoczne są dwa pasma obejmujące 28S i 18S rybosomalne RNA (rRNA). RNA jest uznawane za wysokiej jakości, gdy stosunek pasm (prążków) 28S : 18S jest równy około 2.0 i wyżej. Takie podejście opiera się na ludzkiej interpretacji obrazów żelu, w związku z czym ocena taka jest subiektywna, a także trudno porównywalna między np. dwoma różnymi laboratoriami, a ponadto otrzymane dane rozdziału elektroforetycznego nie mogą być przetwarzane cyfrowo [2]. Szczególnie długie fragmenty mRNA do 10 kb są bardzo wrażliwe na degradację [3].

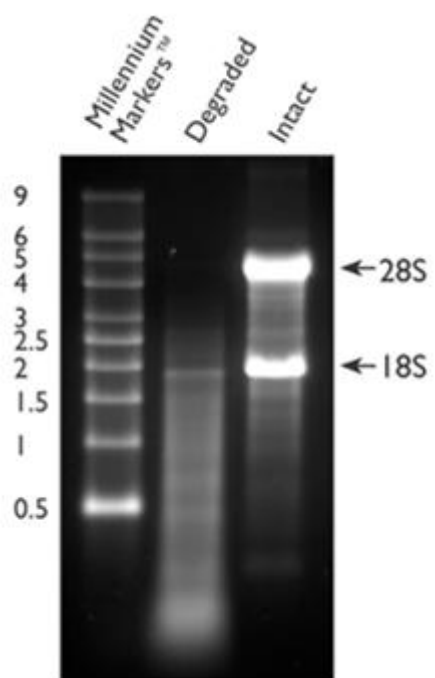
Ekstrakcja i procedury oczyszczania całkowitego RNA muszą spełniać następujące kryteria:

- nie zawierać białka (absorbancji 260 nm/280 nm);
- wolne od genomowego DNA;
- powinny być niezdegradowane (stosunek 28S do 18S powinien być mniej więcej między 1,8 i 2,0, z małą ilością krótkich fragmentów);
- wolne od wszelkich substancji takich jak Mg lub Mn²⁺ +
- wolne od nukleaz dla długotrwałego przechowywania [3].

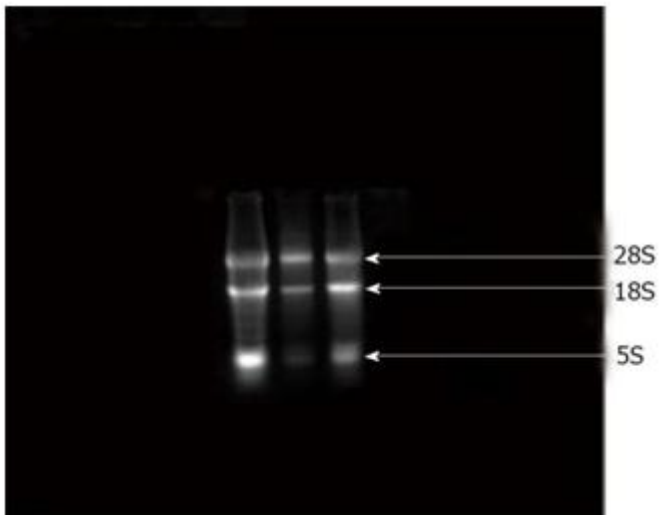
Praca z RNA niskiej jakości może poważnie zagrozić wynikom doświadczalnym i dalszym wnioskom, które są często pracochłonne, czasochłonne i wysoce drogie. Korzystanie z nienaruszonego RNA jest kluczowym elementem dla skutecznego stosowania nowoczesnych molekularnych metod biologicznych, jak QRT-PCR lub analiza mikromacierzy. Obecnie, na rynku dostępne są systemy do automatycznej elektroforezy kapilarnej, które są na dobrej drodze, by stać się standardem w ocenie jakości RNA. Generowane profile dostarczają informacji na temat stężenia RNA, pozwalają na wizualną kontrolę integralności RNA, i generują zbliżone proporcje między masą podjednostek rybosomu [3].

W przypadku oceny jakości wyizolowanego RNA, można zastosować 3 metody, tj.: ocena gęstości optycznej w żelu agarozowym, ocena spektrofotometryczna preparatu, oraz jedną z nowszych metodą tzw. czipową technikę Bioanalyzer 2100 [5].

Ocena gęstości optycznej w żelu agarozowym jest jedną z najstarszych metod stosowanych w laboratoriach. W metodzie tej oznacza się stosunek podjednostek 28S do 18S po rozdziale próbki RNA w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Elektroforezę prowadzi się w 1 lub 1,5% żelu agarozowym, w warunkach denaturujących. Rozdział prowadzi się przez ok. 2 godziny przy napięciu 70V. W wyniku rozdziału otrzymuje się 2 dobrze widoczne frakcje RNA tj. 28S i 18S. Intensywność świecenia frakcji 28S powinna być dwa razy intensywniejsza niż frakcji 18S. Zachowanie tej zależności świadczy o niewystąpieniu degradacji wyizolowanego materiału. Podczas rozdziału RNA na żelu może być widoczna także frakcja mRNA (w postaci smugi), a także migrująca jako pierwsza frakcja tRNA oraz niskocząsteczkowe RNA [5], [6], [8].



Zdjęcie: Frakcje RNA: 28S i 18S,
<http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/388/Is-Your-RNA-Intact-Methods-To-Check-RNA-Integrity.html> [6]



Zdjęcie: Trzy frakcje prawidłowo wyizolowanego RNA (28S, 18S i 5S RNA), <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v2/i6/WJH-2-233-g001.htm> [7].

Pomiar spektrofotometryczny wyizolowanego RNA prowadzi się przy różnych długościach fali (podobnie jak i DNA). Pomiar absorbancji przy 240 nm, pozwala na określenie tła i ewentualnych kontaminacji (podobnie jak pomiar przy 320 nm). Długość 260 nm jest specyficzna dla kwasów nukleinowych, z kolei pomiar przy 280 nm jest długością charakterystyczną dla białek.

Na podstawie wykreślonego OD 260 nm odczytujemy ilość RNA natomiast stosunek OD 260/280 mówi nam o jakości wyizolowanego preparatu. Stosunek długości fali 260/240 nm lub 260/320 nm wskazuje na czystość wyizolowanej próbki. W przypadku, gdy stosunek pomiarów przy długości fal 260/280nm jest większy niż 1,8 to wynik jest akceptowany jako RNA o dobrej jakości. Obecność genomowego DNA w próbce podczas pomiaru OD 260 może prowadzić do przeszacowania realnej ilości RNA [5].

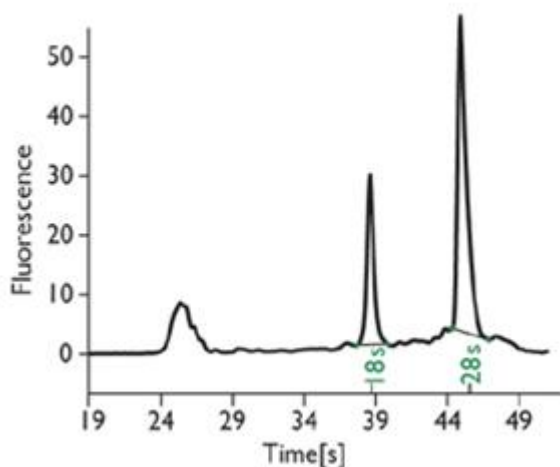
Bardziej specyficznym spektrofotometrycznym pomiarem jest użycie odpowiednich sond znakujących np. RNA RiboGreen dye. Użycie sond pozwala wykryć już 1ng RNA/ml. W porównaniu do pomiaru spektrofotometrycznego, metoda ta jest bardziej specyficzna i nie oznacza ewentualnych zanieczyszczeń próbki białkami i DNA [5].

Czipowa technika Bioanalyzer 2100

W 1999 r. do rozdzielania DNA, RNA i próbek białka został wprowadzony Agilent 2100 bioanalyzer. Od tego czasu jest on główną techniką analizy próbek RNA. Bioanalyzer jest automatycznym bioanalitycznym urządzeniem, wykorzystującym technologię Microfluidics, który zapewnia elektroforetyczną separację w automatyczny i powtarzalny sposób. Niewielkie ilości próbek RNA są rozdzielane w kanałach w zależności od ich masy cząsteczkowej, a następnie wywołana detekcja fluorescencyjna jest wykrywane przez laser. Rezultatem są dane przedstawione jako elektroforogram, gdzie ilość mierzonej fluorescencji koreluje z ilością RNA o danym rozmiarze [2]. Ponieważ dane są produkowane w formacie cyfrowym, mogą być z łatwością przetwarzane w celu umożliwienia dodatkowych obliczeń na podstawie uzyskanych danych surowych [2].

Czipowa technika Bioanalyzer 2100 służy do określania integralności RNA jako liczby od 1-10 w zależności od jakości badanej próbki materiału genetycznego. Jest to jedna z nowszych metod, wykonywana z wykorzystaniem urządzenia Agilent 2100. Podstawę działania tego specyficznego urządzenia stanowi połączenie elektroforezy mikrokapilarnej, mikro płynów, mikroczipów i detekcji fluorescencyjnej. Pomiar wykonywany jest automatycznie, a jedną z zalet tego urządzenia jest fakt, że do analizy wymagane są niewielkie ilości badanego materiału. Analizie można przeprowadzić dysponując już 200 pg RNA.

Dzięki specyficznemu programowi, możliwe jest określenie całościowego RNA w systemie numerowym od 1 do 10, gdzie 1 wskazuje, że RNA jest najbardziej zdegradowane, zaś 10, że jest ono najlepszej jakości. Wynik analizy próbki otrzymuje się w postaci wykresu [4], [5].



Zdjęcie: Wykres rozdziału elektroforetycznego próbek RNA, piki 18S i 28S <http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/388/Is-Your-RNA-Intact-Methods-To-Check-RNA-Integrity.html> [6].

Proces degradacji RNA jest tylko częściowo zrozumiały, ponieważ jest to zależne od rodzaju RNazy, która jest obecna i często jest w połączeniu z procesami fragmentacji. Ponadto, jakość RNA w danym eksperymencie może różnić się w znacznym stopniu od ekstrakcji RNA w innym eksperymencie i musi być pod stałym nadzorem. Przy użyciu precyzyjnej aparatury analitycznej, takiej jak Agilent 2100 bioanalyzer, eksperci są w stanie odróżniać próbki RNA o różnej jakości [2].

Aktualnie za jedną z najbardziej dokładnych metod służących do pomiaru stężenia DNA uważa się ilościowy PCR w czasie rzeczywistym tj. RT PCR (ang. Real-Time PCR). Ten rodzaj PCR dostarcza szczególnie cennych informacji odnośnie ilości oraz jakości amplifikowanego DNA. W porównaniu do innych metod, RT PCR charakteryzuje się specyficnością gatunkową. Ponadto metoda nie daje fałszywie zawyżonych wyników, które spowodowane są obecnością domieszki obcych kwasów nukleinowych, bądź innych związków wywołujących interferencję [1].

Elektroforeza kapilarna

Dzięki postępowi technologicznemu możliwe jest określenie wielkości i stężenia wyizolowanych kwasów nukleinowych znacznie szybciej i precyzyjniej niż dotychczas, a to wszystko za sprawą automatyzacji systemów rozdziału elektroforetycznego biocząsteczek. Rozwój ten zapewniło pojawienie się technik opartych na elektroforezie kapilarnej w tzw. mikrochipach (ang. chip capillary electrophoresis). Tak jak już wspomniano, jednym z pierwszych komercyjnie dostępnych systemów wykorzystujących technologię rozdziału kwasów nukleinowych oparta na chipach jest 2100 Bioanalyzer (Agilent). Do analizy różnych cząsteczek (o różnej wielkości) zaprojektowano odpowiednie odczytniki oraz płytki chipowe [1].

W wyniku przeprowadzonych badań, wielu badaczy stwierdziło, że metoda ta sprawdza się nie gorzej od wcześniej wykorzystywanych metod. Jedną z wielu zalet elektroforezy chipowej jest szybka analiza nawet wielu próbek, oraz niższa ocena analizy jednej próbki w porównaniu do komercyjnie stosowanych testów w identyfikacji osobniczej. Aparat 2100 Bioanalyzer pozwala na analizę 12 próbek w ciągu pół godziny [1]. Wykorzystując ten typ aparatu możliwa jest analiza fragmentów DNA nie przekraczających kilkunastu tysięcy par zasad [1]. Do oznaczania wielkości i stężenia fragmentów dwuniciowego DNA (w zakresie od 1000 do 12000 pz) zaprojektowano zestaw Agilent DNA 12000 LabChip. Wielkość cząsteczek DNA uzyskanych podczas izolacji klasyczną metodą organiczną, mieści się w zakresie 10000-15000pz, zaś za pomocą zestawu DNA IQ System w zakresie 60-10000pz [1].

W doświadczeniu przeprowadzonym przez Gorzkiewicz i wsp. przeprowadzono ocenę przydatności systemu do elektroforezy chipowej, zastosowanej do wstępnej analizy DNA badanego dla potrzeb sądowych. W wyniku przeprowadzonych badań (Gorzkiewicz i wsp.), badacze wywnioskowali, że system 2100 Bioanalyzer w połączeniu z zestawem Agilent DNA LabChip z powodzeniem może być wykorzystywany do analizy ilościowej genomowego DNA, jednakże pomiar ten dotyczy tylko określonych zakresów stężeń [1].

Według przeprowadzonych badań (Gorzkiewicz i wsp.) połączenie obydwóch systemów nie nadaje się do dokładnej oceny stężenia ekstraktów, zarówno tych, które zawierają zdegradowane DNA, jak i tych zawierających bardzo duże stężenia materiału genetycznego (DNA) [1].

Ponadto, system 2100 Bioanalyzer może być wykorzystany do ogólnej oceny wielkości fragmentów DNA (w próbkach zawierających stosunkowo duże stężenie DNA o dobrej jakości). W wyniku doświadczeń stwierdzono, że system 2100 Bioanalyzer niestety nie znajduje większego zastosowania do oceny DNA pochodzącego ze śladów biologicznych (ze względu na trudności w przewidzeniu stężenia i jakości DNA) [1].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. Gorzkiewicz M, Duleba A, Rychlicka E, Woźniak M, Grzybowski T, Śliwka K, 2010. Evaluation Of The Agilent 2100 Bioanalyzer As A Tool For DNA Analysis In Forensic Genetics, Problems of Forensic Sciences 2010, vol. LXXXI, 91-100.

[2]. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T, 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Molecular Biology 2006, 7:3 doi:10.1186/1471-2199-7-3

performance. qRT-PCR real-time the on tceffe the and integrity RNA 2006. W.M., fflafP S, Fleige [3]. Molecular Aspects of Medicine 27 (2006) 126-139

[4]. Ugaz V.M, 2007. Electrophoresis in Microfluidic Systems. Artie McFerrin Department of Chemical Engineering Texas A&M University College Station, TX 77843, USA.

[5]. http://metlab.pl/Oznaczenie_jakosci_RNA_bardzo_wazny_krok_w_badaniach_molekularnych_p38.html

[6].

<http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/388/Is-Your-RNA-Intact-Methods-To-Check-RNA-Integrity.html>

[7]. <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v2/i6/WJH-2-233-g001.htm>

[8]. Słomski R, 2008. Analiza DNA, teoria I praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008. S.61-64

[9]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 347-349

<http://laboratoria.net/artukul/13252.html>

Informacje dnia: [Drżące nanorurki](#) [Naukowcy znaleźli sposób na recykling betonu ADHD](#) [zdiagnozowano u co dziewiątego dziecka w USA](#) [Testy na obecność HPV](#) [Do środowiska trafiło ponad 1 mld komarów GMO](#) [Może to owady uratują nas przed zwałami plastiku](#) [Drżące nanorurki](#) [Naukowcy znaleźli sposób na recykling betonu ADHD](#) [zdiagnozowano u co dziewiątego dziecka w USA](#) [Testy na obecność HPV](#) [Do środowiska trafiło ponad 1 mld komarów GMO](#) [Może to owady uratują nas przed zwałami plastiku](#)

Partnerzy