

[Akceptuję](#)

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](#) [Szkolenia](#) [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.II

Wykorzystanie do oznaczania kwasów nukleinowych metod chemicznych, opiera się na określeniu ilości jednego ze składników wchodzących ich skład. W związku z tym, wśród badanych i oznaczanych składników znajdują się kwas fosforowy, ryboza lub deoksyryboza oraz zasady azotowe. Dokładność i precyzyjność 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 [4].



Metody chemiczne stosuje się do oznaczania ilościowego kwasów nukleinowych w preparatach izolowanych z tkanek, jak i do ilościowego określania zawartości tych związków w tkankach bez wcześniejszego wydzielania (izolacji) kwasów nukleinowych. W tym celu przed przystąpieniem do zastosowania danej metody chemicznej, najpierw stosuje się tzw. frakcjonowanie wstępne [3].

Słowa kluczowe: *metody chemiczne, frakcjonowanie związków fosforowych, wstępna ekstrakcja, metoda Schmidta i Thannhausera, metoda Schneidera, metoda Ogura i Rosen, absorbancja.*

Znanych jest wiele metod frakcjonowania związków fosforowych, z wyodrębnieniem frakcji zawierającej kwasy nukleinowe, przy czym najbardziej znana (w odniesieniu do tkanek i komórek pochodzenia zwierzęcego) jest technika Schmidta i Thannhausera (1945 r.), oraz jako druga technika Schneidera (1945 r.). Obydwie metody, pomimo wielu różnych modyfikacji są stosowane do dziś. Jeżeli zaś chcemy oznaczać zawartość DNA i RNA w materiale pochodzenia roślinnego, to bardzo przydatna jest technika opracowana przez Ogura i Rosen z 1950 roku [3].

Cechą łączącą wszystkie wymienione metody jest to, że w każdej z nich stosuje się wstępną ekstrakcję związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasie, wśród których są wszystkie małowartościowe połączenia organiczne, np. wolne nukleotydy o różnym stopniu ufosforylowania, estry (heksozo- i triozy fosforowe, fosfoenolopirogronian, acetylofosforan i inne), jak również nieorganiczne orto-, meta- i pirofosforany. Z kolei nierozpuszczalna w kwasie pozostałość tkankowa jest źródłem fosfolipidów, kwasów nukleinowych oraz fosfoprotein, w związku z czym przed zanalizowaniem kwasów nukleinowych przeprowadza się najpierw ekstrakcję lipidów. Zarówno związki rozpuszczalne w kwasach jak i związki lipidowe mogą być także osobno badane, stosując w tym celu odrębne analizy [3].

Oznaczanie zawartości kwasów nukleinowych- metoda Schmidta i Thannhausera [3].

W metodzie tej RNA oddziela się od DNA oraz większości białek występujących w tkance, po hydrolizie w 1 M roztworze NaOH lub KOH, przeprowadzonej w temperaturze 37°C w ciągu jednej nocy (w alternatywnie 8 godzin). W zastosowanych warunkach RNA ulega hydrolizie do nukleotydów, z kolei DNA obecne w preparacie pozostaje nierozłożone. W takich warunkach część fosfory fosfoproteidów odszczepia się w postaci fosforanu nieorganicznego. Osad zawierający DNA i białka można wydzielić po wcześniejszym zakwaszeniu zasadowego hydrolizatu (III) za pomocą kwasu solnego lub trichlorooctowego. Po tym zabiegu RNA pozostaje w roztworze w postaci nukleotydów rozpuszczalnych w kwasach. Tak więc zarówno RNA jak i DNA można oznaczyć na podstawie zawartości fosforu w otrzymanych frakcjach (IV i VI), jednakże czułość oznaczenia zależy od czułości metody oznaczania fosforu [1], [3].

W przypadku małej zawartości fosforu nieorganicznego, który pochodzi z fosfoprotein we frakcji (IV), oznaczoną zawartość całkowitego fosforu można uważać w przybliżeniu za odzwierciedlenie ilości RNA. Dokładniejsze oznaczenie zawartości RNA można otrzymać po wytrąceniu nieorganicznych fosforanów z frakcji IV, wtedy to ilość fosforu RNA oblicza się na podstawie różnicy zawartości we

fakcjach IV i V. Jest to ważne przede wszystkim w przypadku tkanek bogatych w fosfor nierozpuszczalny w kwasach i pochodzący nie z nuklein, np. tkanki wątroby lub mózgu (zarówno substancji białej jak i szarej). W celu wytrącenia nieorganicznych fosforanów często stosuje się metodę Delory'ego (1938) [3].

Główną zaletą metody jest możliwość oddzielenia DNA od RNA, co następnie stwarza możliwość oznaczania ich poprzez oznaczenie fosforu, cukru bądź puryn i pirymidyn. Wśród wad metody wymienia się fakt, że frakcja I (odpowiadająca RNA) zawiera związki, które nie są nukleotydami. Ze względu na to, że oznaczenie opiera się na analizie fosforu, zawsze istnieje tendencja do otrzymywania wyników, które są zbyt wysokie. Nienukleotydowe połączenia fosforowe we frakcji I mogą stanowić do 25% całkowitego fosforu tej frakcji w wątrobie, z kolei w tkance nerwowej nawet do 80%. Zawierają one fosfopeptydy i fosforany inozytu. Ponadto, nukleotydy mogą być z łatwością oddzielone od związków towarzyszących i otrzymane w stanie czystym, dzięki zastosowaniu elektroforezy bibułowej, a następnie oznaczane oddzielnie [1].

Inną wadą towarzyszącą tej metodzie jest tendencja do rozkładu DNA w niektórych tkankach, a następnie przesuwania go do frakcji RNA, przy czym zjawisko to zmienia się w zależności od rodzaju tkanki i gatunku zwierzęcia i jest np. o wiele wyraźniejsze w grasicy cielęcej niż w grasicy królika [1].

Oznaczanie fosforu może być przeprowadzone wieloma różnymi metodami analitycznymi m.in. metodą Fiskego i Subbarowa, bądź Allena, Griswolda i innych. Z kolei, metoda Berenbluma i Chaina nadaje się do analizy bardzo małych ilości tkanki (jak np. kultury fibroblastów *in vitro*), w których ilość oznaczanego fosforu jest rzędu 1µg. Dużo bardziej czułe metody oznaczania fosforu zostały opisane przez Norberg (dolna granica 0,5µg fosforu) oraz Engström, która oznacza całkowity fosfor w jednej komórce, jednakże metody te nie są związane ze sposobem rozdzielania kwasów nukleinowych według Schmidta i Thannhausera [1].

Aktualnie znanych jest wiele modyfikacji metody Schmidta i Thannhausera. Zazwyczaj ma to na celu zwiększenie czułości oznaczeń, np. w przypadku gdy zawartość DNA w danej tkance jest niewielka, wtedy też zaleca się wprowadzenie 1% roztworu albuminy jaja, co w konsekwencji powoduje łatwiejsze formowanie się osadu. Ponadto, czułość tej metody zwiększana jest przez wprowadzenie spektrofotometrycznych oznaczeń kwasów nukleinowych. Wtedy to we wszystkich etapach frakcjonowania stosuje się roztwory HClO_4 , które w przeciwieństwie do roztworów CCl_3COOH wykazują niewielki stopień pochłaniania długości fali w zakresie od 257 do 270 nm. Jedną z takich modyfikacji jest metoda Markova i Tsaneva (1960). Dodatkowo zawartość kwasów nukleinowych oznaczonych metodą Schmidta i Thannhausera można także wyliczyć z ilości nukleotydów, które rozdzielone są za pomocą chromatografii lub elektroforezy [3].

Wśród wprowadzonych modyfikacji metody bardzo korzystne okazało się zmienienie kolejności odlipidowania i odmywania związków w rozpuszczalnych kwasach (najpierw przeprowadza się odlipidowanie) wprowadzone przez Niemierkę (1953). Pozwala to na przechowywanie odlipidowanego materiału do dalszych badań, bez rozłożenia frakcji rozpuszczalnej bądź nierozpuszczalnej w kwasach. Zmieniony sposób odlipidowania (tj. aceton/chloroform w stosunku 5:1 w temperaturze 0°C, a następnie etanol/eter w stosunku 3:1 w temperaturze 37°C) sprawia, że materiał jest odwodniony [3].

Tabela: Sposób postępowania preparatywnego w metodzie Schmidta i Thannhausera-frakcjonowanie związków fosforowych [3].

Numer frakcji	Postępowanie	Związki fosforowe wchodzące w skład frakcji
Świeża tkanka	Do analizy należy używać tkanki świeżej bądź zamrożonej w temperaturze -10°C, która jest dokładnie rozdrobniona	
I	3-krotna szybka ekstrakcja homogenatu silnie oziębionego 5%-10% roztworem CCl_3COOH	Związki fosforowe rozpuszczalne w kwasach
II	Ekstrakcja pozostałości tkankowej I 80% etanolem, gorącą mieszaniną etanol/chloroform(w stosunku 3:1) lub mieszaniną etanol/eter (w stosunku 1:1)	Fosfolipidy
III	Hydroliza zasadowa pozostałości tkankowej II w 1 M roztworze NaOH lub w 1 M KOH w temperaturze 37°C przez 8h (1 ml tugu na 100 mg świeżej tkanki)	RNA w postaci nukleotydów, DNA oraz fosfor nienukleotydowy , pochodzący głównie z fosfoprotein
IV	Otrzymanie supernatantu po dodaniu do frakcji III 6 M roztworu HCl w celu zobojętnienia NaOH lub KOH, a następnie CCl_3COOH do ostatecznego stężenia 5-10%. Otrzymany osad DNA należy oddzielić przez odwirowanie w temp. 0°C, a następnie 2x przemyć 5% roztworem CCl_3COOH	Nukleotydy RNA i fosfor nieorganiczny pochodzenia nienukleotydowego (głównie z fosfoprotein).
V	Wytrącanie nieorganicznych fosforanów z frakcji IV, a następnie oznaczanie ich metodą DeLorv'ego	Fosfor nienukleotydowy , głównie fosfor uwalniany się podczas zasadowej hydrolizy fosfoprotein
VI	Do otrzymanego osadu z frakcji III dodaje się 6 M HCl do zobojętnienia oraz CCl_3COOH do stężenia 5%-10%	DNA i białka
VII	Ekstrakt otrzymany po działaniu na frakcję VI 5% roztworem CCl_3COOH w temp. 90°C przez 15 minut	DNA

Oznaczanie zawartości kwasów nukleinowych metodą Schneidera [3].

W metodzie tej RNA i DNA są równocześnie ekstrahowane za pomocą gorącego (90°C) roztworu CCl_3COOH lub HClO_4 , które uwalniają kwasy nukleinowe od znacznej części białka, które wchodzi w skład frakcji nierozpuszczalnej w kwasach [3].

W trakcie ogrzewania kwasy nukleinowe ulegają rozpadowi, a następnie przechodzą do kwaśnego roztworu- jako już rozpuszczalne produkty (frakcja III) [1]. Ze względu na to, że podczas takiej ekstrakcji kwasy nukleinowe (zarówno DNA jak i RNA) rozpadają się do nukleotydów lub swobodnych zasad, niemożliwe jest ich rozdzielenie, można je oznaczać tylko za pomocą specyficznych metod na rybozę i deoksyrybozę [3].

Przeprowadzone badania wykazały dużą zgodność z oznaczeń DNA i RNA według metody Schneidera z oznaczeniami za pomocą metody Schmidta i Thannhausera dla większości tkanek zwierzęcych (w tym dla trzustki, śledziony, grasicy, leukocytów oraz retikulocytów). Podczas oznaczenia wykonanego na tkance mózgowej i nerwowej otrzymano zaś duże różnice wyników. Przyczyną tego mogą być znaczne ilości fosfoprotein, oraz kompleksów białek z inozynofosforanami. Dobre rezultaty otrzymuje się wówczas dzięki zastosowaniu obu metod analizy, a następnie uzupełnieniu ich o oznaczenie pochłaniania w nadfiolecie [3].

W zmodyfikowanej metodzie Schneidera zamiast kwasu trójchlorooctowego używa się kwas nadchlorowy. Główną zaletą tej metody jest jej szybkość i łatwość stosowania, z kolei główną wadą jest fakt, że zarówno DNA jak i RNA nie są rozdzielane, a ich oznaczenie może być wykonane tylko przy pomocy zastosowania reakcji barwnych (swoistych dla pentozy i deoksypentozy, a wynik z kolei zależy od wielu zmiennych czynników) [1].

Należy zaznaczyć, że stosując tą metodę możliwe jest oznaczanie większej ilości fosfoproteidów (prawie dziesięć razy więcej), niż w przypadku posługiwania się metodą Schmidta i Thannhausera [1]. Przedstawioną metodę można zastosować do analizy ilości rzędu paru miligramów lub nawet paru mikrogramów wyjściowego materiału tkanki [1].

Tabela: Sposób postępowania preparatywnego w metodzie Schneidera- frakcjonowanie związków fosforowych [3].

Numer frakcji	Postępowanie	Związki fosforowe wchodzące w skład frakcji
Świeża tkanka	Do analizy należy użyć tkanki świeżej lub mrożonej (-10°C), dokładnie rozdrobnionej	
I	Szybka 3-krotna ekstrakcja homogenatu. W tym celu używa się oziębionego 5-10% roztworem CCl_3COOH	Związki rozpuszczalne w kwasach
II	Ekstrakcja pozostałości tkankowej I za pomocą 80% etanolu, gorącą mieszaniną etanol/chloroform (3:1) albo mieszaniną etanol/eter (w stosunku 1:1)	Fosfolipidy
III	Pozostałość tkankowa po I i II ekstrakcji	DNA, RNA oraz fosfoproteiny
IV	Otrzymanie ekstraktu po działaniu na frakcję III 5% roztworem CCl_3COOH bądź 6% HClO_4 (w temp. 90°C przez 15 minut), pozostały osad należy przemyć 2x kwasem	RNA, DNA+ część fosfoprotein

W roślinach stężenie kwasu nukleinowego jest znacznie niższe niż np. w tkankach zwierzęcych, ponadto występuje w nich wiele różnych związków powodujących zakłócenia podczas izolacji, np. polisacharydy i inne. Tak więc, oprócz szczególnie korzystnych do izolacji i bogatych w kwasy nukleinowe zarodków pszenicy, istnieje tylko fragmentaryczna wiedza na temat normalnych kwasów nukleinowych tkanek roślinnych [2].

Kwas nukleinowy został po raz pierwszy wyizolowany z zarodków pszenicy przez Osborne i Campbell w 1900 roku. Z korzenia jęczmienia po raz pierwszy wyizolowano i scharakteryzowano kwas nukleinowy w 1943-1944 roku przez Takasugi. Z kolei poprawiona procedura do izolacji z zarodka pszenicy zastała podana przez Lusena (1951). Deoksypentozy kwasu nukleinowego (DNA) wydzielili z jąder komórkowych zarodków żyta Feulgen, Behrens i Mahdihassan w 1937 roku. Mirsky i Pollister (1946) selektywnie wyodrębnili pentozy nukleoproteiny z tkanek zwierzęcych z wykorzystaniem 0,14 M chlorku sodu [2].

Thomas i Sherratt (1956) w swoich doświadczeniach do izolacji frakcji kwasów nukleinowych

wykorzystali różne tkanki roślinne, a m.in. tkanki pochodzące z paproci pospolitej, koniczyny, kapusty czy buraka cukrowego [2].

W wyniku frakcjonowania w przeprowadzonego doświadczenia (Thomas i Sherratt, 1956) otrzymano między innymi frakcje deoksypentozy, gdzie preparaty DNA zawierały ok. 20-60% DNA, przy założeniu, że DNA zajmuje ok. 10% fosforu. Najlepsze preparaty zostały uzyskane z materiału pochodzącego z kapusty i koniczyny [2].

Metoda Ogura i Rosen [3].

Postępowanie preparatywne metody Ogura i Rosen zostało opracowane do oznaczania kwasów nukleinowych (DNA i RNA) w ilości rzędu 1 µg w stożkach wzrostu korzeni roślin oraz w pylnikach. Opisane powyżej metody są nieprzydatne do materiału roślinnego, ze względu na występowanie związków przeszkadzających w oznaczeniach, wśród nich np. pentozanów, poliuronidów. Przeprowadzenie wstępnego ekstrahowania tkanki etanolem i mieszanina etanolu z eterem (frakcja I i II) pozwala na oddzielenie rozpuszczalnych w nich związków, które w połączeniu z difenyloaminą dają intensywne purpurowe zabarwienie. Podczas ekstrakcji części nierozpuszczalnej w kwasach (IV) za pomocą 1 M roztworu HClO₄ w temperaturze 4°C wyodrębnia się jedynie RNA, którego zawartość można oznaczyć na podstawie absorbancji ekstraktu przy 260 nm, albo określenia ilości fosforu. Następnie z pozostałości tkankowej ekstrahuje się DNA (za pomocą gorącego roztworu HClO₄, a dalej oznacza ilościowo badając absorbancję przy 270 nm lub zawartość deoksyrybozy albo fosforu [3].

Zawartość kwasów nukleinowych może być oznaczana na podstawie zawartości fosforu, pentozy bądź deoksypentozy lub puryn i pirymidyn. Główną wadą tej metody jest fakt, że niektóre rodzaje DNA ulegają wymyciu podczas zastosowania zimnego kwasu nadchlorowego, w wyniku czego pojawiają się one we frakcji RNA [1].

Metoda Ogura i Rosen nie może być stosowana do wszystkich rodzajów tkanek, ponieważ nie dostarcza dobrych wyników analizy np. podczas ekstrakcji RNA z drożdży równocześnie wymywa się część DNA. Ponadto badając materiał pochodzenia bakteryjnego tą techniką, należy znacznie wydłużyć czas ekstrakcji RNA- nawet do 30 godzin. Metoda Ogura i Rosen może być także z powodzeniem stosowana do oznaczania kwasów nukleinowych w tkankach zwierzęcych. Wtedy to DNA ekstrahuje się 1 M kwasem nadchlorowym w temperaturze 80°C przez 30 minut [1], [3].

Tabela: *Postępowanie preparatywne według techniki Ogura i Rosen- frakcjonowanie związków fosforowych [3].*

Numer frakcji	Postępowanie preparatywne	Związki fosforowe wchodzące w skład frakcji
Świeża tkanka	Świeża tkanka może być przechowywana w 70-90% etanolu w temperaturze 0°C, przed przystąpieniem do ekstrakcji tkankę należy zhomogenizować	
I	Otrzymany homogenat ekstrahować 70% etanolem, z kolei pozostałość tkankową przemyć 70% etanolem zawierającym 0,1% HClO ₄ . Całą procedurę prowadzić w temperaturze 4°C	Związki rozpuszczalne w etanolu
II	Przeprowadzenie 2-krotnej ekstrakcji pozostałości tkankowej I mieszaniną 96% etanolu i eteru (w stosunku 3:1)	Związki rozpuszczalne w kwasach
III	Szybka, 2-krotna ekstrakcja (na zimno) pozostałości tkankowej II 0,2M roztworem HClO ₄	RNA, DNA, fosfoproteiny
IV	Pozostałość tkankowa III	RNA, DNA, fosfoproteiny
V	Ekstrakcja frakcji IV 1 M roztworem HClO ₄ przeprowadzona w temperaturze 4°C przez 18 godzin. Osad otrzymany po ekstrakcji przemyć 2-krotnie 1 M roztworem HClO ₄ , a otrzymane supernatanty połączyć	RNA, DNA, fosfoproteiny RNA
VI	2-krotna ekstrakcja pozostałości tkankowej V 0,5M roztworem HClO ₄ w temperaturze 70°C przez 20 minut	DNA + fosfor fosfoprotein

Literatura:

- [1]. Davidson J.N, F.R.S, 1969. The Biochemistry of the Nucleic Acids, Six Edition , 1969; s. 110-112.
[2]. Thomas A.J., Sherratt S.A., 1956. The Isolation of Nucleic Acid Fractions from Plant Leaves and their Purine and Pyrimidine Composition, Bioch.1956, Vol.62, s. 1-4
[3]. Kłyszewko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 347-351
[4]. Słomski R, 2008. Analiza DNA, teoria i praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008. S.61-64

<http://laboratoria.net/artukul/13304.html>

Informacje dnia: [Potrzebne regulacje dot. norm i zasad hałasu turbin wiatrowych](#) Naukowcy zbadali, jakie obrazy zapadają częściej w pamięć Człowiek poprzez emisję gazów spowodował ocieplenie Sztuczna inteligencja diagnozuje spektrum autyzmu Autonomiczne hulajnogi elektryczne Wydano pierwszy atlas geologiczny Księżyca [Potrzebne regulacje dot. norm i zasad hałasu turbin wiatrowych](#) Naukowcy zbadali, jakie obrazy zapadają częściej w pamięć Człowiek poprzez emisję gazów spowodował ocieplenie Sztuczna inteligencja diagnozuje spektrum autyzmu Autonomiczne hulajnogi elektryczne Wydano pierwszy atlas geologiczny Księżyca [Potrzebne regulacje dot. norm i zasad hałasu turbin wiatrowych](#) Naukowcy zbadali, jakie obrazy zapadają częściej w pamięć Człowiek poprzez emisję gazów spowodował ocieplenie Sztuczna inteligencja diagnozuje spektrum autyzmu Autonomiczne hulajnogi elektryczne Wydano pierwszy atlas geologiczny Księżyca

Partnerzy