

[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](#) [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. III

Kwasy nukleinowe, nukleotydy, nukleozydy i zasady azotowe mają zdolność selektywnego pochłaniania światła w nadfiolecie (UV). Maksimum przypada na 260 nm. Zjawisko absorpcji znalazło zastosowanie w analizie chemicznej. Właściwość ta wynika z obecności w kwasach nukleinowych układów purynowego lub pirymidynowego, które zawierają sprzężone wiązania podwójne. Na intensywność i charakter pochłaniania światła nie mają wpływu obecne reszty monocukrow, a także grupy fosforanowe, w związku z tym widma absorpcji zasad azotowych i odpowiadających im nukleotydów są bardzo podobne [7].

Słowa kluczowe: absorbanca, spektrofotometria, oznaczanie kwasów nukleinowych, metoda Tsaneva i Markova, oznaczanie fosforu, zmodyfikowaną metodą Schmidta i Thannhausera, metamizol, metodą Horeckera, metodą Delory'ego



Absorbanca DNA nie jest addytywną sumą absorpcji wszystkich zasad azotowych wchodzących w jego skład, a to ze względu na fakt, że rzeczywista molowa absorpcja jest niższa o około 40% od wartości teoretycznie obliczonej na podstawie składu kwasu nukleinowego. Przedstawione zjawisko nosi nazwę efektu hipochromowego, jest ono związane z helikalnym uporządkowaniem przestrzennym obu nici polinukleotydowych, opisanym strukturą drugorzędową i trzeciorzędową DNA [7].

Preparaty kwasów nukleinowych mogą być zanieczyszczone białkami, których maksimum pochłaniania światła przypada w paśmie długości równej 280 nm. Własności spektroskopowe makrocząsteczek pozwalają określić przybliżoną czystość preparatów kwasów nukleinowych. Obliczeń dokonuje się na podstawie wartości stosunku absorpcji przy 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}). Wolny od zanieczyszczeń dwuniciowy DNA (ds. DNA) ma wartość współczynnika A_{260}/A_{280} równą 1,8, czysty RNA około 2, czyste białka poniżej 1 (około 0,5). Preparat DNA, którego wartość współczynnika A_{260}/A_{280} jest większa od wartości 1,8, może być zanieczyszczony RNA, gdy współczynnik A_{260}/A_{280} ma wartość poniżej 1,8- można mniemać, że preparat zanieczyszczony jest białkami [7].

W przypadku pomiarów spektroskopowych zasadnicze znaczenie ma znajomość stężeń molowych kwasów nukleinowych. Stężenie kwasów nukleinowych można otrzymać z pomiaru absorpcji przy długości fali równej $\lambda = 260$ nm (jest to maksymalna absorpcja promieniowania nadfioletowego przez DNA) w przypadku, gdy znamy molowy współczynnik ekstynkcji ϵ :

$$C = A_{260} / \epsilon \cdot l$$

gdzie l - to długość drogi optycznej w kuwecie. Przyjmuje się, że wartości współczynnika ekstynkcji wynosi $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [8].

Absorpcja kwasów nukleinowych zmierzona przy długości fali równej 230 nm odzwierciedla zanieczyszczenia pochodzące od węglowodorów, białek bądź fenolu. W przypadku czystych próbek wartość A_{260}/A_{230} powinna wynosić 2,2. Z kolei, absorpcja zmierzona przy długości fali 325 nm może być wyznacznikiem wytrąceń w roztworze lub zanieczyszczeń pochodzących od samej kuwety [8].

Spektrofotometryczna metoda oznaczania kwasów nukleinowych według Tsaneva i Markova [2], [6]. W metodzie według Tsaneva i Markova, do rozdziału RNA i DNA w zasadowym hydrolizacie III, zaś do ekstrakcji DNA używa się HClO_4 , co pozwala przeprowadzić swobodnie w danych ekstraktach oznaczenia w nadfiolecie. Absorbancję otrzymanych ekstraktów RNA i DNA mierzy się przy dwóch

długościach fali. Dla DNA jest to 268 i 284 nm, zaś RNA mierzy się przy 260 i 286 nm [2], [6].

Tabela: Postępowanie preparatywne - frakcjonowanie związków fosforowych według metody Tsaneva i Markova [2], [6].

| Numer frakcji | Postępowanie | Związki fosforowe wchodzące w skład frakcji |
|---------------|--|--|
| Świeża tkanka | Do analizy można użyć tkanki świeżej lub mrożonej (w temperaturze -10°C, dokładnie rozdrobnionej) | |
| I | Szybka 3-krotna ekstrakcja homogenatu za pomocą silnie oziębionego 5%-10% roztworu CCl_2COOH | Fosfolipidy |
| II | Ekstrakcja pozostałości tkankowej I 80% etanolem, gorącą mieszaniną etanol/chloroform (w stosunku 3:1) lub mieszaniną etanol/eter (w stosunku 1:1) | Związki rozpuszczalne w kwasach |
| III | Hydrolyza zasadowa pozostałości tkankowej II w 1 M NaOH lub w 1 M KOH - w temperaturze 37°C przez 8h (1 ml ługu na 100 mg świeżej tkanki) | RNA w postaci nukleotydów, DNA i fosfor z fosfoprotein |
| IV | Supernatant otrzymany po dodaniu do zasadowego hydrolizatu (III) HClO_2 najpierw do zobojętnienia a następnie do ostatecznego stężenia 3% (temperatura 0°C) | |
| V | Osad otrzymany z frakcji III przez jej zakwaszenie HClO_2 | DNA i białka |
| VI | 2-krotna ekstrakcja 1 M roztworem HClO_2 w temperaturze 80°C przez 30 minut | DNA |

Oznaczanie zawartości związków fosforowych w tkance trzustki zmodyfikowaną metodą Schmidta i Thannhausera [3], [6].

Modyfikacja pierwotnej metody Schmidta i Thannhausera polega na zastosowaniu odlipidowania zgodnego z metodą Niemierki (1953), a także na zastosowaniu roztworów HClO_4 do oddzielania DNA i związków rozpuszczalnych w kwasach [3], [6].

Jako materiał do przeprowadzenia oznaczenia używa się świeżej trzustki bydlęcej. Pierwszym etapem metody jest odlipidowanie tkanki. W tym celu należy sporządzić homogenat tkankowy z mieszaniną aceton/chloroform (w stosunku 5:1) w homogenizatorze nożowym. Następnie, homogenat należy pobrać do próbki wirówkowej w ilości odpowiadającej 300 mg świeżej tkanki. Dalej przeprowadzić 3-krotną ekstrakcję za pomocą mieszaniny aceton/chloroform zmieszanych w stosunku 5:1 w temperaturze 0°C , a dalej 3-krotną ekstrakcję mieszaniną etanol/eter (3:1) w temperaturze 37°C . Po każdej ekstrakcji próbkę odwirować w wirówce z chłodzeniem ($1000 \times g$, 5 minut) [3], [6].

Supernatanty, które zawierają związki lipidowe należy połączyć i dopełnić jedną z mieszanin odlipidujących do znanej objętości. Po tym etapie następuje ekstrakcja związków rozpuszczalnych w kwasach. W tym celu odlipidowaną tkankę ekstrahuje się w próbce wirówkowej 3-krotnie $0,2 \text{ M}$ roztworem HClO_4 (roztwór dodaje się porcjami po 4-5 ml) w temperaturze $0-4^\circ\text{C}$ przez 10 minut [3], [6].

Po każdej ekstrakcji próbkę należy zwirować w wirówce z chłodzeniem (ok. $2000 \times g$, 10 minut). Powstające supernatanty zbierać w cylindrze miarowym i dopełnić do 15 ml $0,2 \text{ M}$ roztworem HClO_4 . Otrzymany osad związków nierozpuszczalnych w kwasach przemyć 2 razy zimnym 96% roztworem etanolu (dodawać porcjami po 4-5 ml), dalej przemyć 3-krotnie mieszaniną etanol/eter (w stosunku 1:1), oraz 1 raz eterem. Osad wysuszyć na powietrzu, a następnie w eksykatorze próżniowym [3], [6].

Kolejnym etapem metody jest hydroliza związków nierozpuszczalnych w kwasach. W tym celu osad tych związków zalać 5 ml 1 M roztworu KOH , a po dokładnym wmieszaniu próbkę umieścić w cieplarni w temperaturze 37°C , na 18 godzin. Dalej przeprowadzić rozdzielanie RNA i DNA- w tym celu otrzymany hydrolizat ochłodzić do 0°C i zobojętnić w łaźni lodowej za pomocą 50% roztworu HClO_4 (wobec papierka wskaźnikowego), po czym do próbki dodać roztwór 50% HClO_4 (z takim wyliczeniem by końcowe stężenie HClO_4 w hydrolizacie wynosiło 3%). Dokładnie wymieszać, a próbkę wirówkową umieścić w łaźni lodowej na 30 minut, aby uformował się osad. Po tym czasie próbkę odwirować (ok. $1000 \times g$, 10 minut) w wirówce z chłodzeniem [3], [6].

Osad, który zawiera DNA po wirowaniu przemyć 3-krotnie za pomocą roztworu HClO_4 (porcjami po 4-5 ml), po każdym przemyciu próbkę odwirować w wirówce z chłodzeniem (jak wyżej). Otrzymany po wirowaniu supernatant należy połączyć z cieczami z przemycia i dopełnić do objętości równej 20 ml. Osad przemyć 2 razy zimnym 96% roztworem etanolu (dodawanego porcjami po 4-5 ml), oraz 1 raz 96% roztworem etanol/eter (zmieszanych w stosunku 1:1) i 1 raz samym eterem [3], [6].

Ostatnim etapem metody jest oznaczenie zawartości fosforu metodą Horeckera (we wszystkich otrzymany w trakcie metody związkach tj. w całkowitym homogenacie, we frakcji lipidowej, w supernatancie- fosfor całkowity rozpuszczalny w kwasach, w supernatancie- fosfor RNA i fosfoprotein, oraz w osadzie- tj. DNA-P) [3], [6].

Zawartość fosforu w poszczególnych produktach wyliczyć w $\text{mg}\%$ świeżej tkanki- przeprowadzając bilans związków fosforowych. Ze względu na małą zawartość fosfoprotein w tkance trzustki fosfor supernatantu można (w przybliżeniu) przyjąć za fosfor RNA (RNA-P) [3], [6].

Oznaczanie zawartości fosforu metodą Horeckera i wsp. (1940) [1], [6].

W trakcie badań nad enzymami stało się pożądanym by opracować metodę, która pozwalałaby na

określenie ilościowe nawet niewielkich ilości fosforu w białkach. Dostępne metody były niezadawalające ze względu na to, że wymagały albo przygotowania większej próby niż było to możliwe, albo dlatego, że nadmiar kwasu siarkowego, który był potrzebny do trawienia zakłócał obliczenia tj. określenie ilości fosforu w próbce [1], [6].

Kuttner i Cohen zgłaszali metodę, która umożliwiała określenie niewielkich ilości fosforu (1,7 µg), ale ilość kwasu siarkowego, który jest dozwolony w trakcie oznaczania fosforu był, z kolei niewystarczający do poprzedzającego trawienia. Berenblum and Chain byli w stanie określić mniej niż 1µg, ale ich metoda ma tę wadę, że wymaga ekstrakcji z niewielką ilością alkoholu izobutyłowego [1], [6].

Poprzez modyfikację metody Fiske i Subbarowa i za pomocą spektrofotometru fotoelektrycznego opisane przez Hogness, Zscheile i Sidwell, 1 µg fosforu można określić z dokładnością do 3 procent. Aby zapewnić całkowite trawienie i uniknąć utraty fosforu, zwiększa się ilość używanego kwasu siarkowego. Końcowe stężenie kwasu siarkowego jest 2 M zamiast 0,5 M- tak jak jest określone w oryginalnej metodzie. Intensywność zabarwienia (kolor niebieski) kompleksu kwasu fosfomolibdenowego zwiększa się wraz z ogrzewaniem próbki- zgodnie z zaleceniami innych badaczy tj. Benedict i Theis. W temperaturze pokojowej kolor jest stabilny przez kilka godzin. Intensywność zabarwienia określa się spektrofotometrycznie i na podstawie określonego standardu oblicza się ilość fosforu [1], [6].

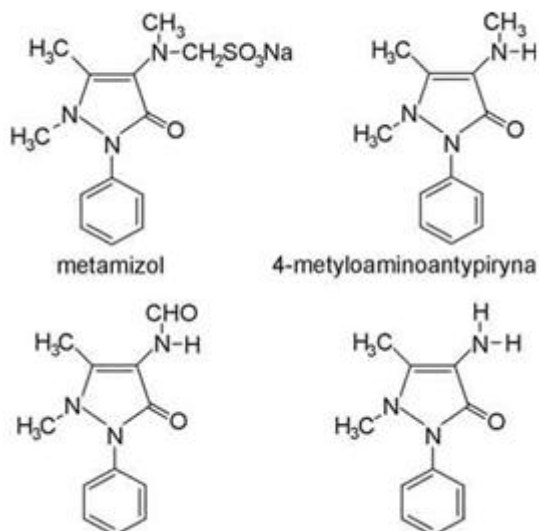
Metody kolorymetryczne powszechnie stosowane są do oznaczania fosforu nieorganicznego, który zależy od tworzenia heteropolikwasu „niebieskiego molibdenu”, z kwasu fosfomolibdenowego w wyniku stosowania różnego rodzaju środków redukujących, w tym np. metamizol (Guirgis i Habib, 1971) [5].

Metamizol jest solą sodową kwasu fenylo-dwumetylopirazolonometylaminometasulfonowego (C₁₁H₁₁N₂O)₂CH₂SO₃Na+H₂O (ryc. 1) - o masie cząsteczkowej 351. Jest on prawie białym, krystalicznym proszkiem, który łatwo rozpuszcza się w wodzie i alkoholu metylowym. Z kolei, jest trudno rozpuszczalny w spirytusie i całkowicie nierozpuszczalny w eterach.

Współczesna wiedza na temat metamizolu została przedstawiona w przeglądowej pracy Mészáros w 2001 r. [5], [9].

Metamizol (lub methampyron), niedrogi związek stosowany jako środek przeciwbólowy. W Polsce metamizol znany jest od wielu lat jako preparat o nazwie pyralgina i stosowany szeroko w leczeniu bólu, także tego pooperacyjnego. Pomimo, iż metamizol stosowany jest w praktyce lekarskiej od lat dwudziestych ubiegłego wieku, kiedy to został wprowadzony do leczenia w 1922 r., mechanizm działania tego związku został poznany bliżej dopiero w ostatnich latach [9].

W swoich doświadczeniach Guirgis i Habib (1971), zastosowali metamizol by sprawdzić czy będzie on przydatny przy ustalaniu ilości fosforu nieorganicznego w krwi i moczu, ponieważ wydaje się być dobrym związkiem redukującym [5].



Rys. <http://www.czytelniamedyczna.pl/174,metamizol-lek-ciagle-nowoczesny.html>

W metodzie tej próbkę o zawartości fosforu od 3-10 µg należy zmineralizować (w probówkach) dodając 0,5 ml stężonego roztworu H₂SO₄ do pojawienia się białych dymów, po czym dodać 1-2 krople 72% roztworu HClO₄. Po mineralizacji do probówki wprowadzić ok. 8 ml H₂O, a po dokładnym wymieszaniu zawartości probówki dodać 0,5 ml 5% roztworu molibdenianu (VI) amonu [6]. Po ponownym wymieszaniu dodać 0,5 ml 0,2% roztworu eikonogenu (tj. sól sodowa kwasu 1,2,3-aminonaftolosulfonowego) lub amidolu (tj. chlorowodoru 2,4-diaminofenolu) z dodatkiem 12 g Na₂S₂O₅ i 1,2 g Na₂SO₃). Całość dopełnić wodą do 10 ml. W podobny sposób należy wykonać próbę kontrolną [6].

Przygotowane próbki umieścić w łaźni wodnej na 15 minut, a następnie po ochłodzeniu należy oznaczyć absorbancję przy długości fali $\lambda=720$ nm. Aby odczytać zawartość fosforu w badanych próbkach należy sporządzić krzywą kalibracyjną w zakresie 1-15 μg fosforu (P) [6].

W metodzie tej intensywność zabarwienia mieszaniny niższych tlenków molibdenu zwiększa się wyniku ogrzewania analizowanych próbek we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut [6].

Oznaczanie zawartości fosforu nieorganicznego pochodzącego z fosfoprotein metodą Delory'ego [4], [6].

Opisana poniżej metoda jest przystosowana do oznaczania fosforanów nieorganicznych w obecności substancji przeszkadzających w redukcji kompleksu fosfomolibdenowego. Zasada metody opiera się na wytraceniu nieorganicznych fosforanów w postaci $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, osadzonego na MgCO_3 [4], [6].

Roztwór, który zawiera nieorganiczny fosforan- pochodzący z fosfoprotein, należy odpipetować do skalowanych probówek (o objętości 15 ml). Następnie, zawartość probówki zubożyć (w obecności fenoloftaleiny), dodając kroplami roztwór stężonego NH_3 , a po zubożeniu dodać dodatkowo 0,2 ml tego odczynnika. Do probówki wprowadzić 1 ml 2,5% roztworu CaCl_2 oraz 1 ml 0,5% wodnej zawiesiny MgCO_3 . Zawartość probówki należy dokładnie wymieszać, po czym zostawić na 30 minut. Po tym czasie próbkę ponownie wymieszać i odwirować . Otrzymany po wirowaniu supernatant ostrożnie zlać (odrzuć), a ścianki probówki (wewnątrz) osuszyć bibułą [4], [6].

Otrzymany osad przemyć za pomocą 5 ml 2% roztworu NH_3 , próbkę odwirować, supernatant zlać a ścianki probówki osuszyć bibułą (jak wyżej). Dalej, osad rozpuścić w 1,1 ml 60% HClO_4 . Dodać ok. 10 ml H_2O , 1 ml 5% roztworu molibdenianu (VI) amonu, 0,5 ml roztworu eikonogenu (tj. sól sodowa kwasu 1,2,3-aminonaftolosulfonowego: 2% roztwór eikonogenu z dodatkiem 12 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ i 1,2 g Na_2SO_3) i uzupełnić wodą do objętości równej 15 ml. PO inkubacji próbki przez 10 minut, oznaczyć absorbancję roztworu w fotokolorymetrze przy $\lambda= 720$ nm. Zawartość roztworu należy obliczyć przez porównanie z absorbancją roztworów wzorcowych[6], [4].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

- [1]. Horecker B.L., Ma T.S., Haas E, 1940. Note on the determination of microquantities phosphorus, 15 June 1940. J.Biol. Chem., 36: 775-776
- [2]. Tsanev R., Markov G.G., 1960: Substances interfering with spectrophotometric estimation of nucleic acids and their elimination by the two-wavelength method. Biochim. Biophys. Acta, 42: 442-452.
- [3].Schmidt G., Thannhauser S.J, 1945. J. Biol. Chem., 161: 83-99; Walter Z., 1970: Praca habilitacyjna, UŁ.
- [4]. Delory C., Charles P., Ledoux L., 1938. A note on the determination of phosphate in the presence of interfering substances. Biochem. J., 32: 1161-1162.
- [5]. Guirgis F.K., Habib Y.A., 1971.Use of a New Reducing Agent, Metamizol, in Determining Inorganic Phosphorus in Blood and Urine. Clinical Chemistry , Vol. 17, No. 2, 1971. S. 78-81
- [6]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 351-359
- [7]. [<http://biochigen.slam.katowice.pl/praktikum/013.pdf>]
- [8].http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Leki/Dydaktyka/Kultury/lab/Porownanie_ilosci_i_%20jakosci_DNA_wyzolowanego_z_komorki_roslinnej_i_zwierzecej.pdf
- [9]. <http://www.czytelniamedyczna.pl/174,metamizol-lek-ciagle-nowoczesny.html>]

<http://laboratoria.net/artukul/13334.html>

Informacje dnia: [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzinę na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzinę na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedzinę na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#)

Partnerzy