

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Porównanie parametrów DNA określanych metodą spektrometrii UV-Vis przy 2 mm i 10 mm drodze przechodzenia wiązki światła przez kuwetę

MAGDALENA GRZYŃSKA, ANETA STRACHECKA, GRZEGORZ BORSUK

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej

Słowa kluczowe: DNA, spektrometria, A260/A280, A260/A230, A320

STRESZCZENIE

Większość danych pochodzących z piśmiennictwa prezentuje rutynowo dwa parametry dotyczące izolatów DNA, a mianowicie jego stężenie oraz zanieczyszczenie białkami. Bardzo ważnym parametrem często pomijanym w doniesieniach naukowych jest zanieczyszczenie próbek DNA odczynnikami do izolacji. Zanieczyszczenia te mogą hamować działanie polimerazy DNA i enzymów restrykcyjnych. W ocenie spektrofotometrycznej istotne znaczenie ma droga optyczna kuwety, ponieważ przy 10 mm nie zawsze możliwy jest pomiar badanych parametrów DNA. Celem pracy było określenie metodą spektroskopii UV-Vis parametrów DNA wyizolowanego za pomocą dwóch komercyjnych zestawów przy dwóch drogach przechodzenia wiązki światła przez kuwetę (2 mm i 10 mm) oraz względem dwóch różnych prób ślepych, tj. wody i buforu, w którym zostało zawieszona DNA.

Comparison of DNA methods defined in UV-Vis spectrometry with a 2 mm and 10 mm light beam passing through the cuvette

Keywords: DNA, spectrometry, A260/A280, A260/A230, A320

ABSTRACT

Most of the data in this literature presents two parameters that routinely isolate DNA, namely its concentration and level of protein contamination. A very important factor that is often overlooked in scientific reports is contamination of DNA samples with isolation reagents. These impurities can inhibit the activity of a DNA polymerase and restriction enzymes. When assessed spectrophotometrically the optical path of the cuvette is of great importance, because at 10 mm, it is not always possible to measure the parameters of DNA. The aim of this study was to determine the method of UV-Vis spectroscopy parameters for the DNA isolate using two commercial kits on two paths passing a beam of light through a cuvette (2 mm and 10 mm) and the two different blind tests of water and a buffer in which the DNA was suspended.

1. WSTĘP

Głównym celem izolacji jest uzyskanie z możliwie jak największą wydajnością wysokocząsteczkowego DNA, przy jednoczesnym oczyszczeniu próbki z białek i inhibitorów enzymów, które mogłyby utrudniać następne etapy pracy z DNA. Dokładne i staranne przeprowadzenie izolacji DNA ma bardzo duży wpływ na jego czystość, a co za tym idzie na przydatność w dalszych badaniach. Nawet niewielka domieszka fenolu lub etanolu w roztworze DNA powoduje wyraźne zmniejszenie wydajności PCR, ponieważ są to silne inhibitory polimerazy DNA. Wyizolowany DNA można poddać ocenie pod względem jego stężenia, jakości, a także poziomu zanieczyszczenia odczynnikami chemicznymi. Jeżeli parametry jakościowe i ilościowe preparatu DNA nie są zadowalające, można przeprowadzić jego doczyszczanie. Na ogół DNA zanieczyszczony jest związkami organicznymi, które zostały przefiltrowane na przykład przez rozszczelnione mechanicznie złoża lub nie zostały strawione przez proteinazę. Doczyszczanie rutynowo stosuje się na złożach selektywnych, które mają za zadanie oczyszczenie próbki i jej dodatkowe zagęszczenie [1].

Precyzyjną metodą oceny ilości i jakości uzyskanego preparatu DNA jest pomiar absorpcji promieniowania ultrafioletowego przy użyciu spektrofotometru. Urządzenie to pozwala mierzyć wartości absorpcji przy określonych długościach fali. W przypadku preparatów DNA określa się wartość absorpcji przy długości fali 260 nm oraz 320 nm. Z odczytanych wartości obliczane jest stężenie DNA.

Pomiar absorpcji przy długościach fal z zakresu 220-320 nm pozwala ocenić czystość uzyskanego preparatu DNA. Obecność różnych substancji w badanej próbce jest odczytywana przy określonych długościach fal, np. EDTA, etanol czy polisacharydy przy długości fali 230 nm, fenol przy 270 nm, białka przy 280 nm, natomiast drobniny komórkowe przy 320 nm. Dla czystego preparatu DNA, stosunek wartości absorpcji przy długości fali 260 nm do 280 nm zawiera się w przedziale 1,7 – 1,9 [2]. Inni autorzy sugerują wartość od 1,8 do 2,0 [3]. Drugim parametrem służącym do określenia czystości DNA jest stosunek absorpcji 260 nm do 230 nm. Kwas DNA uważany jest za czysty, jeżeli wartość waha się w granicach 1,8 – 2,2. Poniżej tych wartości uważa się, że kwas nukleinowy został zanieczyszczony odczynnikami ma-

jącymi maksimum absorpcji przy 230 nm. Dla długości fali 320 nm można określić także poziom drobin komórkowych w próbce. Im ten współczynnik jest niższy, tym próbka jest czystsza [4].

Celem pracy było określenie metodą spektroskopii UV-Vis parametrów DNA otrzymanego ze świeżej krwi za pomocą dwóch komercyjnych zestawów do izolacji przy dwóch drogach przechodzenia wiązki światła przez kuwetę tzn. przy 2 mm oraz przy 10 mm, a także względem dwóch różnych prób ślepych: wody i buforu, w którym zostało zawieszona DNA.

Określono następujące parametry DNA: koncentracja, czystość pod względem zanieczyszczenia białkami i odczynnikami do izolacji oraz zanieczyszczenia drobinami komórkowymi.

2. MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiła krew pobrana z żyły odłokciowej (*v. basilica*) od 10 kur rasy Polbar utrzymywanych w Stacji Dydaktyczno-Badawczej Zwierząt Drobnych im. Laury Kaufman, należącej do Katedry Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

2.1 Izolacja DNA z krwi

Izolacja DNA została przeprowadzona w oparciu o dwa różne zestawy do izolacji DNA genomowego: Genomic Midi AX firmy A&A Biotechnology (w dalszej części określane jako zestaw AX) oraz QIAamp DNA Blood Mini Kit (w dalszej części określane jako zestaw Q). Zestaw Genomic Midi AX firmy A&A Biotechnology opiera się na kolumnach z membranami jonowo-wymiennymi, które wiążą DNA. Zestaw QIAamp DNA Blood Mini Kit zawiera kolumny ze złożem krzemionkowym do wiązania DNA. Izolacja DNA z krwi ptasiej wzbogacona jest o etap pipetowania przy użyciu uciętej końcówki do momentu powstania pianki koloru kakaowego.

2.2 Ocena spektrofotometryczna

Pomiary zostały przeprowadzone metodą spektroskopii UV-Vis, za pomocą Biofotometru firmy Eppendorf przy długościach fali: A230 nm, A260 nm, A280 nm oraz A320 nm. Dodatkowo urządzenie automatycznie obliczało stężenie [$\mu\text{g}/\text{ml}$], a także proporcje A260/A280 nm i A260/A230 nm, pozwalające określić czystość wyizolowanego DNA.

Dla każdej próbki roztworu DNA dwukrotnie przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne w stosunku do próbki odniesienia (zerowej), którą stanowiła woda destylowana oraz roztwór buforu TE o takim samym stężeniu jak w próbkach badanych dla oznaczeń dokonanych przy pomocy zestawu Genomic Midi AX. Analogicznie postąpiono z próbkami DNA izolowanymi przy pomocy zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit. Próba zerową była woda destylowana oraz roztwór buforu AE o takim samym stężeniu jak w próbkach badanych dla oznaczeń dokonanych przy pomocy zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit. Pomiaru dokonano przy użyciu kuwet z tworzywa sztucznego dołączonych do BioPhotometru, wykorzystując możliwość pomiaru przy dwóch długościach drogi światła przechodzącego przez kuetę, a mianowicie 2 mm i 10 mm. Jak podaje producent próbki, można mierzyć w długości warstwy 10 mm, jak i 2 mm. Obracając kuetę o 90° można dokonać pomiaru, unikając rozcieńczenia próbki [4]. Próby, dla których nie odczytano wartości przy 10 mm długości drogi światła przechodzącego przez kuetę, rozcieńczono 2-krotnie, po czym ponownie dokonano odczytu. Po zakończeniu każdego z pomiarów biofotometr automatycznie dokonywał kalibracji. Przed każdym pomiarem próbki DNA worteksomowano.

2. 3 Metody statystyczne

Uzyskane izobaty DNA podzielono na grupy w zależności od zestawu użytego do izolacji, długości drogi optycznej kuwety oraz roztworu zerowego. W tak zestawionych grupach porównywano średnie wartości cech testem t-Studenta. Oznaczeń statystycznych dokonano dla prób nierozcieńczonych.

3. WYNIKI BADAŃ

3.1 Stężenie DNA w izolatach

Na podstawie przeprowadzonej analizy spektrofotometrycznej DNA otrzymanego przy pomocy dwóch komercyjnych zestawów do izolacji uzyskano następujące wyniki przedstawione w Tabelach 1-4. Bardzo duży zakres wartości wyizolowanego DNA między dwoma użytymi kitami może wynikać z braku gotowych zestawów do izolacji DNA z krwi ptasiej.

Uzyskano niewielkie różnice w wynikach odczytując stężenie DNA względem próby zerowej.

Nie uzyskano wyników stężenia DNA w przypadku izolacji kitem Genomic Midi AX przy długości drogi optycznej 10 mm. Te same próby odczytane przy drodze optycznej 2 mm charakteryzowały się bardzo wysoką koncentracją DNA. Większą koncentrację DNA uzyskano przeprowadzając izolację kitem Genomic Midi AX (Tab. 1).

Tabela 1 Stężenie DNA [$\mu\text{g/ml}$], $n=10$
Table 1 Concentration of DNA [$\mu\text{g/ml}$], $n=10$

Długość drogi optycznej		2 mm		10 mm	
		\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Kit	Próbka zerowa				
AX	TE	364,50 ^C	81,54	388,23*	88,24
Q	AE	113,61 ^D	55,93	97,43	35,33
Łącznie		239,06	128,6	242,83	61,78
AX	H ₂ O	368,73 ^C	81,35	370,02*	85,85
Q		117,06 ^D	56,42	99,28	40,43
Łącznie		242,895	145,99	234,65	63,14

Oznaczenia dotyczą tabel 1-4

A, B – średnie w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $P \leq 0,01$

C, D – średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $P \leq 0,01$

* – próby dwukrotnie rozcieńczone

3.2 Zanieczyszczenie izolatów DNA białkami

Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia białkami była zbliżona zarówno dla próbek uzyskanych w wyniku izolacji krwi kitem AX jak i Q. Wyniki odczytane względem wody nie różniły się znacznie od wyników odczytanych względem buforu. Wyniki uzyskane przy długości drogi optycznej 2 mm i 10 mm dla kitu Q były porównywalne, natomiast nie określono czystości DNA w przypadku izolacji kitem AX przy długości drogi optycznej 10 mm. Wartości współczynnika A260/A280 dla odczytanych próbek mieściły się w zalecanych granicach 1,8 - 2,0.

3.3 Zanieczyszczenie izolatów DNA odczynnikami do izolacji

Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia odczynnikami do izolacji była zróżnicowana, zarówno pomiędzy użytym kitem do izolacji jak i za-

stosowanym roztworem do odczytu – woda lub bufor, a także rodzajem kuwety (2 mm, 10 mm).

Tabela 2 Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia białkami (A260/A280), n=10

Table 2 DNA purity in terms of protein contamination (A260/A280), n=10

Długość drogi optycznej		2 mm		10 mm	
Kit	Próbka zerowa	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
AX	TE	1,87	0,008	1,77*	0,018
Q	AE	1,85	0,017	1,82	0,039
Łącznie		1,86	0,020	1,79	0,029
AX	H ₂ O	1,88	0,009	1,76*	0,020
Q		1,87	0,017	1,84	0,047
Łącznie		1,87	0,015	1,80	0,034

Tabela 3 Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia odczynnikami do izolacji (A260/A230), n=10

Table 3 DNA purity in terms of contamination by reagents for isolation (A260/A230), n=10

Długość drogi optycznej		2 mm		10 mm	
Kit	Próbka zerowa	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
AX	TE	2,23 ^c	0,164	2,02*	0,606
Q	AE	1,65 ^d	0,601	1,53	0,576
Łącznie		1,94	0,520	1,77	0,590
AX	H ₂ O	1,79 ^c	0,108	1,38*	0,372
Q		1,28 ^d	0,453	1,19	0,424
Łącznie		1,53	0,414	1,29	0,398

Tabela 4 Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia drobinami komórkowymi (A320), n=10

Table 4 DNA purity in terms of cell particles (A320), n=10

Długość drogi optycznej		2 mm		10 mm	
Kit	Próbka zerowa	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
AX	TE	0,038 ^b	0,031	0,129 ^a	0,153
Q	AE	0,026 ^b	0,020	0,070 ^a	0,040
Łącznie		0,032	0,026	0,099	0,113
AX	H ₂ O	0,039 ^b	0,036	0,142 ^a	0,157
Q		0,026 ^b	0,018	0,068 ^a	0,030
Łącznie		0,032	0,028	0,105	0,116

Istotne różnice zaobserwowano pomiędzy użytymi kitami przy odczycie 2 mm zarówno według wody, jak i buforu. Wartość współczynnika A260/A230 była większa dla kitu Genomic Midi AX.

3.4 Zanieczyszczenie izolatów DNA drobinami komórkowymi

Pewną część zanieczyszczeń izolatu DNA mogą stanowić drobinny komórkowe oraz nierozpuszczalne związki absorbujące przy długości fali A320.

Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia drobinami komórkowymi była zróżnicowana. Odczyt wyników przy długości drogi optycznej 2 mm różnił się od odczytu przy 10 mm.

Preparaty izolowane kitem AX zawierały więcej drobin komórkowych niż preparaty izolowane kitem Q. Parametr A320 powinien osiągać wartość zbliżoną do 0,00.

4. DYSKUSJA

DNA wyizolowano przy pomocy komercyjnych zestawów do izolacji DNA z krwi. Zestawy te są przeznaczone przede wszystkim do krwi ssaczek, której erytrocyty nie zawierają jąder, co ułatwia izolację. Krew ptasią od ssaczek odróżnia m.in. to, że wszystkie elementy morfotyczne tj. erytrocyty, trombocyty, granulocyty są jądrzaste [5].

Jądrowe DNA organizmów eukariotycznych jest związane z białkami histonowymi i niehistonowymi. Białka te charakteryzują się tym, że zawierają domenę specyficznie rozpoznającą daną sekwencję. Niedostateczne doczyszczenie preparatu DNA może inhibować reakcje enzymatyczne takie jak PCR, RT-PCR i inne [1]. Wartość współczynnika A260/A280 między 1,8, a 2,0 [3] oznacza, że preparaty kwasów nukleinowych są wystarczająco oczyszczone z białek i mogą być traktowane jako „czyste” DNA. Jeżeli wartość tego współczynnika jest mniejsza od 1,7, wskazuje to na zanieczyszczenie białkami, natomiast gdy jest większa od 2,0 na zanieczyszczenie RNA [6]. Wyniki przedstawione w tej pracy zawierały się w podanych wyżej wartościach i stanowią potwierdzenie prac innych badaczy [7, 8].

Większość danych pochodzących z piśmiennictwa prezentuje rutynowo dwa parametry dotyczące izolatów DNA, a mianowicie

cie jego stężenie oraz zanieczyszczenie białkami. Bardzo ważnym parametrem często pomijanym w doniesieniach naukowych jest zanieczyszczenie próbek DNA odczynnikami do izolacji. Do odczynników tych należy m.in. EDTA i etanol, a główne pasmo absorbancji dla tych substancji wynosi 230 nm. Najczęściej kolejnym etapem analiz genetycznych są badania oparte na PCR. Na wydajność amplifikacji ma wpływ obecność w próbce inhibitorów reakcji PCR [9]. Inhibitory mogą być obecne w oryginalnej próbce takiej jak krew czy tkanka lub mogą zostać wprowadzone do próby podczas pobierania materiału biologicznego (EDTA) lub procesu izolacji (etanol). Inhibitory można usunąć podczas procedury oczyszczania DNA. Mogą one zmniejszać dostępność ko-faktorów (np. Mg^{+2}) lub zakłócać działanie polimerazy DNA, w wyniku czego PCR zachodzi z obniżoną wydajnością. Zanieczyszczenia zawarte w próbce mogą hamować lub nawet uniemożliwić działanie enzymów restrykcyjnych [3]. Współczynnik A260/A230 jest stosowany jako miara zanieczyszczenia DNA odczynnikami do izolacji. Przyjmuje się, że czyste DNA ma $A260/280 > 1,8$ i $A260/230 > 1,8$. Na wartość tych parametrów nie-

znacznie wpływa użyty bufor, ale generalnie ich wartość dla dobrze wyizolowanego DNA oscyluje wokół 1,8–2,05. Krytyczne dla reakcji enzymatycznych są wartości $A260/280$ i $A260/230 < 1,4$. Niższe wartości mogą spowodować brak amplifikacji podczas PCR. Przy $A260/230 < 1,0$ nawet RT-PCR może okazać się problemem. Dlatego w przypadku niedostatecznej czystości należy powtórzyć ekstrakcję alkoholem [3]. Również inni badacze w swoich pracach donoszą o podobnych problemach z uzyskaniem czystego DNA pozbawionego odczynników do izolacji [10, 11].

5. PODSUMOWANIE

Stwierdzono statystycznie istotne różnice w stężeniu DNA izolowanego różnymi zestawami do izolacji. Różnice w stężeniu DNA w izolatach odczytywane przy dwóch próbach zerowych (woda i bufor) nie były statystycznie istotne. Standardowo do oceny DNA zawieszono w buforze można używać wody. Lepszym zestawem do izolacji DNA z krwi kurzej był kit Genomic Midi AX, natomiast wydajniejsze odczyty uzyskano przy drodze optycznej- 2 mm.

LITERATURA

- [1] Gruszczyńska J., Nowak Z. 2007, Wybrane techniki i metody analizy DNA. Warszawa, Wydawnictwo SGGW, 14-25.
- [2] Rybczyńska M., Wybrane zagadnienia z biologii molekularnej. Poznań, Wydawnictwo Naukowe UM, 11-27, 2002.
- [3] Słomski R., Analiza DNA. Przykłady analiz DNA. Teoria i praktyka. Poznań Wydawnictwo UP, 2008.
- [4] www.eppendorf.com
- [5] Kaczanowska E., Gromysz Kałkowska K., Szubartowska E., Przegląd badań nad hematologią ptaków domowych. Przegląd Zoologiczny 1986, XXX, 3, 279-292.
- [6] Khosravinia H., Narasimha Murthy H.N., Thertha Parasad D., Pirany N., Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. 2007, African Journal of Biotechnology, 6, 481-486.
- [7] Boujtita N., Isolating Genomic DNA from Whole Blood, Thermo Fisher Scientific, 2008.
- [8] De Jiménez E., González J.L., Dominguez J.L., Saloma E.S., Characterization of DNA from Differentiated Cells. Eur J Biochem, 1974, 45, 25-29.
- [9] Budzyńska A., Kaczmarek A., Gospodarek E., Diagnostyka molekularna bakteryjnych zakażeń krwi. Postępy Nauk Medycznych, 12, 2008, 828-833.
- [10] Couch J. A., Fritz P.J., Isolation of DNA from Plants High in Polyphenolics, Plant Mol Biol Rep, 8(1), 1990, 8-12.
- [11] Davidson M.W., Griggs B.G., Boykin D.W., Wilson W.D., Molecular Structural Effects Involved in the Interaction of Quinolinemet hanolamines with DNA. Implications for Antimalarial Action, J of Med Chem, 1977, 20 (9), 1117-1122.