

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Barbora Řezáčová

Optimalizace postupu určování koncentrace oligonukleotidů z UV absorpčních měření

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Studijní program: Fyzika
Studijní obor: obecná fyzika

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce **Prof. RNDr. Josefu Štěpánkovi, CSc.**, za jeho cenné rady a odborné připomínky. Poděkování za možnost použití měřicích přístrojů náleží **Fyzikálnímu ústavu UK, oddělení biomolekul.** Za pomoc při práci s pH metrem děkuji také **RNDr. Evě Kočíšové, PhD.** a **RNDr. Kateřině Hofbauerové, PhD.**

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne

Barbora Řezáčová

Obsah

1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1 NUKLEOVÉ KYSELINY.....	6
2.1.1. <i>Struktura nukleových kyselin.....</i>	6
2.1.2. <i>Stabilizace prostorové struktury NA</i>	8
2.1.3. <i>Vlastnosti NA ovlivňující tvorbu komplexů</i>	9
2.2 UV ABSORPČNÍ SPEKTROSKOPIE	10
2.2.1. <i>Absorpční spektra.....</i>	10
2.2.2. <i>Lambert-Beerův zákon</i>	11
3. EXPERIMENT	12
3.1. PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	12
3.1.1 <i>Spektrometr</i>	12
3.1.2 <i>pH metr.....</i>	13
3.2 VZORKY	14
3.2.1. <i>Oligonukleotid.....</i>	14
3.2.2. <i>Pufr.....</i>	14
4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	15
4.1. SPEKTROMETR	15
4.1.1 <i>Přesnost stanovení propustnosti.....</i>	15
4.1.2 <i>Ověření stability spektrometru v čase</i>	16
4.1.3 <i>Shrnutí vlivu spektrometru</i>	17
4.2. VLV MANIPULACE S KYVETOU.....	18
4.3. ROZTOK OLIGONUKLEOTIDU	19
4.3.1. <i>Chyba ředění.....</i>	19
4.3.2. <i>Závislost na koncentraci solí v roztoku</i>	20
4.3.3. <i>Závislost na pH</i>	20
4.3.4. <i>Závislost na teplotě.....</i>	21
4.3.5 <i>Shrnutí vlivu ředění vzorku a parametrů roztoku.....</i>	24
5. POROVNÁNÍ DOPORUČOVANÝCH METOD URČOVÁNÍ EXTINKČNÍHO KOEFIČIENTU	25
5.1. METODA NEJBLIŽŠÍCH SOUSEDŮ.....	25
5.1.1 <i>Ambion Oligonucleotide MW and Extinction Coefficient Calculator.....</i>	25
5.1.2. <i>Owczarzy.....</i>	25
5.1.3. <i>Trilinkbiotech.....</i>	26
5.2. SOUČET EXTINKČNÍCH KOEFICIENTŮ BÁZÍ V OLIGONUKLEOTIDU	27
5.2.1. <i>Sigma Aldrich.....</i>	27
5.2.2. <i>Eva Freisinger.....</i>	27
5.2.3. <i>Genscript corporation.....</i>	27
5.3. SHRNUÍ K PUBLIKOVANÝM VÝPOČTŮM EXTINKČNÍHO KOEFICIENTU	28
6. ZÁVĚR	29
7. LITERATURA.....	30

Název práce: Název bakalářské práce
Autor: Barbora Řezáčová
Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK
Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.
e-mail vedoucího: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt: : Předložená práce se zabývá problematikou přesného určování koncentrace oligonukleotidů – krátkých úseků nukleových kyselin - z UV absorpčních měření. Oligonukleotidy a jejich analoga představují v dnešní době nadějná chemoterapeutika pro strategii potlačení exprese nežádoucích genů. Při stanovování jejich fyzikálních a chemických vlastností je nutná co nejpřesnější znalost jejich koncentrace v používaných roztocích. Naše práce systematicky vyšetřuje jednotlivé vlivy na výsledky měření UV absorpce a porovnává v literatuře doporučované postupy z hlediska jejich věrohodnosti a přesnosti.

Klíčová slova: nukleotid, Lambert -Beerův zákon, absorpční spektroskopie, extinkční koeficient

Title: Optimizing the method of oligonucleotide concentration determination by UV absorption spectroscopy
Author: Barbora Řezáčová
Department: Institute of Physics
Supervisor: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.
Supervisor's e-mail address: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: This work deals with problems of precise determination of the oligonucleotide (short section of nucleic acid) concentration by means of UV absorption measurement. Nowadays oligonucleotides and their analogs represent promising chemotherapeutics for the strategy of harmful gene silencing. As accurate as possible knowledge of their concentrations in the solutions under study is required to determine correctly their physico-chemical properties. Our work investigates systematically individual influences upon results of UV absorption measurements and compares the procedures recommended in literature according to their reliability and accuracy.

Keywords: nucleotide, absorption spectroscopy, the Beer-Lambert Law, extinction coefficient

Kapitola 1

Úvod

Od roku 1953, kdy byla dvěma vědci z Cambridge - Jamesem Watsonem a Francisem Crickem - objevena charakteristická struktura nositelky genetické informace, deoxyribonukleové kyseliny (DNA), se věnuje stále větší pozornost zkoumání vlastností nukleových kyselin (NA) a procesů genové exprese. V současné době máme k dispozici mnoho poznatků o struktuře a funkci NA. Jsme rovněž schopni provádět řízenou syntézu úseků NA (oligonukleotidů) o délce až dvou set bází.

Oligonukleotidy lze použít jako prostředky k detekci komplementárních sekvencí v DNA nebo RNA, neboť s nimi ochotně komplexují a vytvářejí lokální dvojšroubovici. Tento princip se využívá u analýz nukleových kyselin například na Genovém čipu, v Southernově blotu, při FISH (fluorescent in situ hybridization) a rovněž při přípravě umělých genů. Nabízí se rovněž možnost využití oligonukleotidů jako chemoterapeutik. Za tímto účelem se zkoumají jejich různé chemické modifikace, které by vedly k jejich vyšší stabilitě v buněčném prostředí.

Fyzikálně-chemické vlastnosti syntetických oligonukleotidů jsou na oddělení fyziky biomolekul FÚ UK zkoumány zejména pomocí spektroskopických a teoretických metod. Pro experimentální studia zaměřená na získání termodynamických parametrů úseků NA a jejich komplexů má zásadní význam stanovení jejich koncentrace v roztoku. Standardně je k tomu využívána UV absorpční spektroskopie. Jedná se o principiálně jednoduchou metodu, která je založena na Lambert-Beerově zákoně (viz kap. 2.2.2.). Pro vysoce přesná měření koncentrace musíme však vzít v potaz celou řadu vlivů, které by mohly výsledek experimentu zkreslit. Naše práce má za úkol systematicky vyšetřit a zhodnotit jednotlivé vlivy na přesnost měření UV absorpce. Zároveň byla věnována pozornost i postupům měření a vyhodnocení doporučeným v literatuře, které byly porovnávány z hlediska jejich věrohodnosti a přesnosti.

Kapitola 2

Teoretická část

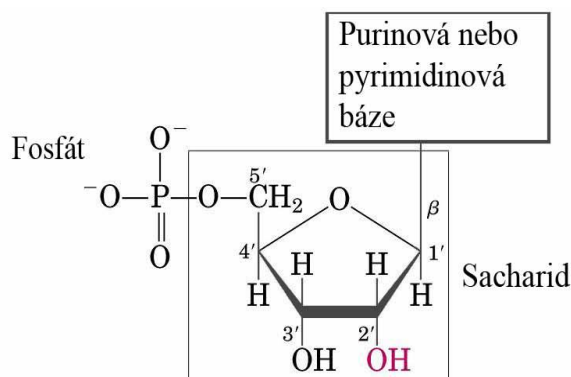
2.1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou nositelky dědičné informace, a proto jsou základem pro program činnosti buňky i organismu jako celku. Lze je nalézt ve všech buněčných formách života a ve virech.

Nukleové kyseliny lze rozdělit na dvě třídy: na ribonukleové kyseliny (RNA) a na deoxyribonukleové kyseliny (DNA). V DNA je uložena genetická informace organismů, replikuje se během dělení buňky a její úseky jsou přepisovány do komplementární báze v molekule RNA. RNA je v organismech funkční molekula, která plní několik funkcí. Mediátorová RNA (mRNA) obsahuje přepis informace z DNA o struktuře proteinů, které se mají syntetizovat. Transferová (tRNA) slouží k přenosu aminokyselin na místo syntézy bílkovin. Ribozomální rRNA je součástí ribozómů, kde plní funkční i strukturní úlohu.

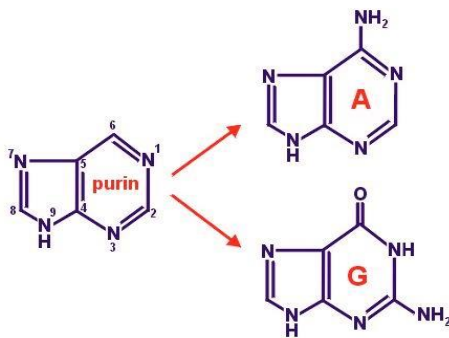
2.1.1. Struktura nukleových kyselin

Základními stavebními složkami nukleových kyselin jsou nukleotidy. Nukleotidy lze v živých organismech nalézt také ve formě trifosfátů jako zdroje energie, například ATP (adenosintrifosfát) a GTP (guanosintrifosfát). Deriváty nukleotidů jsou pak součástí koenzymů, které se podílejí na přenosu protonů a chemických skupin. Jako cyklické diestery cGMP (cyklický guanosinmonofosfát) a cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) hrají roli v přenosu informace mezi vnějším prostředím a vnitřkem buňky.

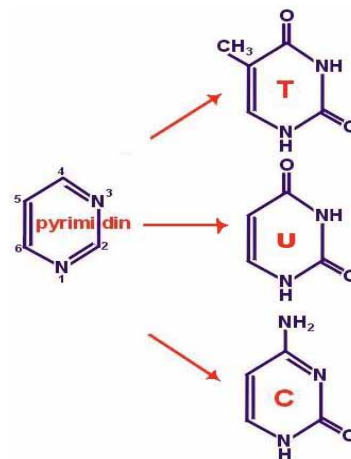


Obrázek 2.1 Nukleotid

Základní složky nukleotidu jsou báze, sacharid a fosfát. Bázi tvoří dusíkatá heterocyklická molekula odvozená od molekuly purinu nebo pyrimidinu (viz obrázek 2.2. a obrázek 2.3.)



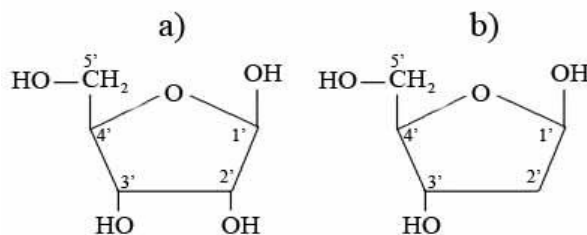
Obrázek 2.2 Purin a z něj odvozené báze
A -Adenin, G -Guanin



Obrázek 2.3 Pyrimidin a z něj odvozené báze
T -Thymin, U -Uracil, C -Cytosin

Základní purinové báze jsou adenin a guanin. Jejich chemické vzorce jsou na obrázku 2.2. Základní pyrimidinové báze jsou thymin, uracil a cytosin, kde uracil s thyminem jsou si funkčně ekvivalentní. Jejich chemický vzorec je na obrázku 2.3. Uracil nalezneme pouze v RNA, zatímco thymin, methylovaná forma uracilu se vyskytuje především v DNA, ale lze jej nalézt i v některých transferových RNA (tRNA). V DNA platí takzvaná Chargaffova pravidla, tedy počet adeninových a thyminových zbytků je stejný ($A=T$) a počet guaninových a cytosinových také ($G=C$).

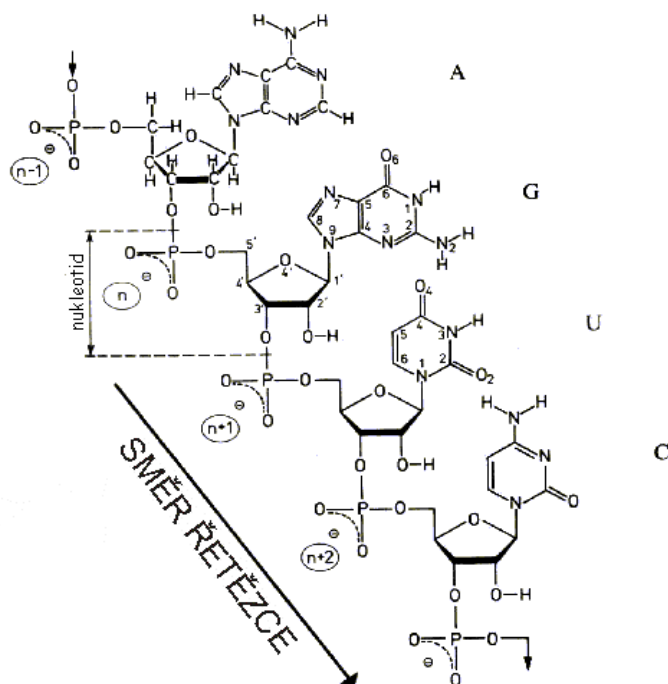
Sacharid v nukleotidech je derivátem furanu, tzn. že má pětičlenný kruh. U RNA je to β -ribofuranosa, zatímco u DNA β -2-deoxyribofuranosa (viz obrázek 2.4).



Obrázek 2.4 Sacharidy nukleových kyselin: a) β -ribofuranosa, b) β -2-deoxyribofuranosa

Spojení sacharidu s bází označujeme jako nukleotid. Nukleosid, který je fosforylovaný na jedné z volných cukerných hydroxylových skupin, tvoří nukleotid (viz obrázek 2.1).

Nukleotidy se mohou navzájem spojovat do lineárního řetězce pomocí fosfodiesterové vazby, která se utvoří mezi hydroxyly na uhlících sousedních cukrů v polohách 3' a 5'. Podle počtu jednotek lze pak úseky NA rozlišovat na mono-, oligo- a polynukleotidy. Oligonukleotidy jsou středně dlouhé úseky nukleotidů, typicky s dvaceti nebo méně bázemi. Automatické syntetizátory nám v současnosti dovolují řízenou syntézu řetězce o délce až dvou set bází. Lze tak vyrobit oligonukleotidy s požadovaným bázovým složením. Kromě přirozené vazby 3'-5' lze vytvořit i alternativní spojení, například fosfodiesterovou vazbu mezi uhlíky v polohách 2' a 5', která se v přírodě běžně nevyskytuje. Primární struktura nukleové kyseliny je určena sekvencí jednotlivých nukleotidů. Schematické znázornění řetězce RNA je na obrázku 2.5.



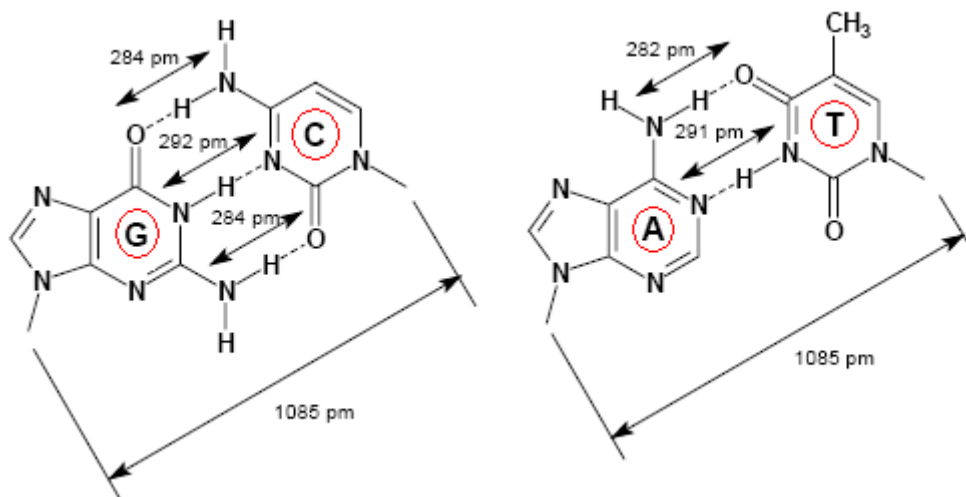
Obrázek 2.5. Struktura vlákna RNA, Saenger, 1984

2.1.2. Stabilizace prostorové struktury NA

Vodíkové vazby (vodíkové můstky) jsou středně silné vazebné interakce mezi molekulami, jsou podstatně slabší (řádově 10x) než kovalentní nebo iontová vazba. Protože se při rozpadu dvojšroubovice mohou alternativně vytvářet mezi bázemi a vodou, strukturu NA příliš nestabilizují; zato hrají důležitou roli při specifickém párování bází. Ve vodíkové vazbě se uplatňují elektrostatické i kvantově-mechanické interakce. Tvoří se především u silně elektronegativních prvků, jako fluor, kyslík a dusík, které jsou schopny v dostatečné míře odčerpát elektronovou hustotu od atomu vodíku. Tvorba vodíkových vazeb mezi bázemi je podpořena jejich stohováním (viz níže). Vodíkové vazby jsou spolu s rozměry idealizovaných G-C a A-T párů bází na obrázku 2.6.

Stohování (stacking) bází způsobují hydrofobní interakce a slabé Londonovské interakce. Ty vedou k přitažlivým silám mezi π -elektrony aromatických cyklů sousedních bází ve šroubovici. Závisí na vzájemné orientaci bází, na jejich sekvenci, na velikosti jejich překryvu i na délce řetězce (s délkou stacking roste). Stohování je nejsilnější pro dvojice bází purin-purin a nejslabší pro dvojici pyrimidinů. Hraje velkou roli v udržení stability NA v polárních rozpouštědlech, protože jeho prostřednictvím lze uvnitř šroubovice vytvořit hydrofobní prostor, kde se mohou tvořit a stabilizovat vodíkové můstky.

Iontové síly mezi PO_2^- skupinami a kationty snižují elektrostatickou repulzi záporně nabitých fosfátových skupin cukr-fosfátového skeletu a tím výrazně přispívají ke stabilizaci šroubovicového komplexu.



Obrázek 2.6. Vodíkové můstky mezi bázemi G-C a A-T spolu s jejich rozměry

2.1.3. Vlastnosti NA ovlivňující tvorbu komplexů

pH má na stabilitu komplexů velký vliv. Obecně se dá říci, že při vyšším pH ztratí uracil, thymin a guanin proton z vodíkového můstku s komplementární bází v komplexu. Při nižší hodnotě pH může naopak dojít k protonaci bází a tím k záměně původně akceptorového místa pro vodíkovou vazbu za donorové. Stabilita komplexu může být ovlivněna i protonací koncových fosfátových skupin v nukleotidech.

Ke stabilizaci pH se používají pufrы, které jsou schopny udržet pH roztoku v určité oblasti dané vlastnostmi této látky, tzv. pufrovací kapacitou.

Při zahřátí roztoku s dvojšroubovicí NA na určitou charakteristickou teplotu se její struktura zhroutí, obě vlákna se oddělí a zaujmou konformaci náhodného klubka. Přechod mezi těmito dvěma stavy lze dobře pozorovat pomocí UV absorpční spektroskopie. S nárůstem teploty dochází k porušení stackingu sousedních bází v komplexu NA a přitom lze pozorovat nárůst absorbance ve spektru NA. Jedná se o tzv. hypochromní efekt. Hypochromní změnu DNA obvykle sledujeme při jedné vlnové délce (260nm). Denaturaci DNA lze popsat jako tání 1D tuhého tělesa a tak lze charakteristický průběh tohoto jevu označit za „křivku tání“. Teplotou tání pak označujeme teplotu, při které se uvolní polovina složek tvořící komplexy.

Stabilita komplexu DNA a jeho teplota tání závisí na povaze rozpouštědla, délce řetězce, sekvenci bází, druhu a koncentraci kationtů, které jsou přítomny ve vodném roztoku a pH. Obecně se dá říci, že s poměrným zastoupením G-C párů v dvojšroubovici DNA roste i teplota tání.

U samostatného vlákna polynukleotidu dochází při růstu teploty k narušování stohování bází a molekula přechází z uspořádané helikální struktury do struktury neuspořádaného klubka. Každá báze se přitom chová do velké míry nezávisle na ostatních. Přechod mezi těmito dvěma stavy je pozvolný a ani v teplotním intervalu 0-100°C nebude úplný. Teplotní závislost absorbance má zde téměř lineární průběh.

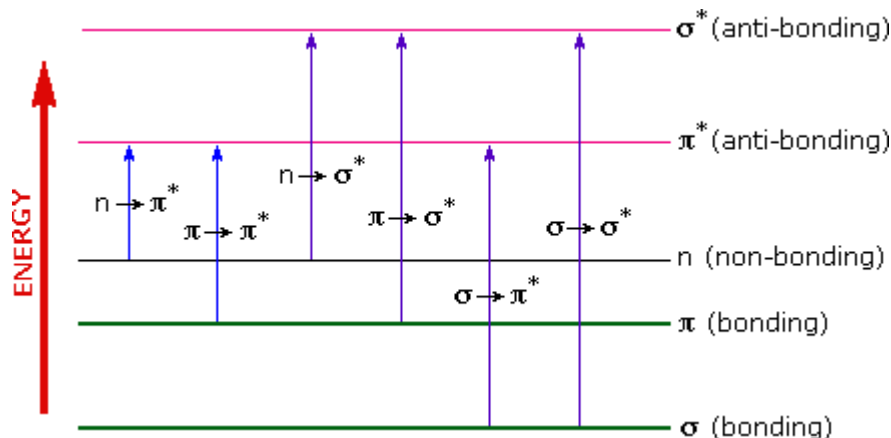
2.2 UV absorpční spektroskopie

2.2.1. Absorpční spektra

Molekulu si lze představit jako soubor nabitých částic, které jsou určitým způsobem rozložené, pohybují se a vzájemně interagují. Tyto vlastnosti popisujeme určitým elektronově vibračním stavem molekuly. Interakcí kvant elektromagnetického záření s molekulami v látce pak může docházet k neelastickým jevům, tedy k přechodům mezi jednotlivými elektronově vibračními hladinami. Při jednofotonových rezonancích je pravděpodobnost indukce těchto přechodů největší, když je energie fotonu shodná s energetickým rozdílem dvou stacionárních stavů v molekule. Jedním ze základních druhů jednofotonových přechodů je absorpce, při které dochází k přechodu z nižšího do energeticky vyššího stavu. Pravděpodobnost přechodů je vyjádřena Einsteinovými koeficienty.

Viditelná část spektra obsahuje fotony s energií od 36 do 72 kcal/mol, ultrafialové spektrum do 200 nm pak ještě zvýší tento interval až na 143 kcal/mol. UV záření pod 200 nm je absorbováno vzduchem a běžně se při měření elektronové absorpce nepoužívá.

Výše uvedené energie jsou postačující k tomu, aby umožnily excitaci molekulového elektronu na orbital s vyšší energií. Pokud charakterizujeme elektronové stavy pomocí obsazení molekulových orbitalů, pak můžeme absorpční spektra popsat přechody mezi molekulovými orbitaly σ , σ^* , π , π^* , n . Orbitaly bez hvězdičky jsou vazebné, s hvězdičkou antivazebné a n jsou nevazebné. Na obrázku 2.7 je znázorněn energetický diagram elektronových přechodů mezi těmito orbitaly.



Obrázek 2.7 Diagram elektronových přechodů mezi vybranými molekulovými orbitaly (převzato z [15])

Když jsou molekuly vzorku vystaveny záření o energii fotonu, která odpovídá energii potřebné k přechodu elektronu na vyšší orbital, dojde k absorpci části světelné energie. Spektrometr zaznamenává vlnové délky a jim odpovídající velikost absorpce. Výsledkem je absorpční spektrum jako graf závislosti absorpance na vlnové délce.

Ve spektrech molekul v roztoku se při běžné teplotě mimo elektronových přechodů uplatní i změny vibrace a rotace molekul a interakce s ostatními molekulami, které se v čase mění a liší se u jednotlivých molekul. Proto mají elektronová absorpční spektra většiny molekul tvar širších spojitých pásů a ne ostrých linií.

Přechody $\pi \rightarrow \pi^*$ převládají u molekul s násobnými vazbami. Velký význam mají pro molekuly nukleových kyselin, kde se tyto přechody uplatní u všech bází, přičemž maximum dlouhovlnného absorpčního pásu se pohybuje kolem 260nm.

2.2.2. Lambert-Beerův zákon

Intenzita záření se při průchodu optickým prostředím snižuje. Tento pokles lze charakterizovat pomocí absorbance A (optické hustoty), která je definována vztahem:

$$A = \log \frac{I_0}{I}, \quad (2.1)$$

kde I_0 je počáteční hodnota intenzity záření a I je hodnota intenzity po průchodu látkou.

V optickém prostředí dochází k exponenciálnímu poklesu intenzity s dráhou, uraženou zářením. Tuto závislost vyjadřuje Lambertův zákon, který pokládá absorbanci přímo úměrnou zářením uražené dráze x .

$$A = bx, \quad (2.2)$$

kde b značí látkovou konstantu, absorpční (extinkční) koeficient. Tento zákon platí za podmínek, kdy záření procházející vzorkem nenarušuje jeho termodynamickou rovnováhu.

Při biofyzikálních aplikacích zkoumáme vlastnosti molekul zpravidla v kondenzovaném prostředí. Často se používají silně zředěné roztoky jednoho druhu absorbujících molekul v neabsorbujícím rozpouštědle. Koncentrační závislost absorpčního koeficientu pak lze vyjádřit pomocí Beerova zákona:

$$b = \varepsilon c, \quad (2.3)$$

kde ε je konstanta charakterizující absorbující látku tzv. molární absorpční (extinkční) koeficient a c je koncentrace molekul v rozpouštědle.

Absorbanci lze tedy podle Lambert-Beerova zákona získat jako:

$$A = \varepsilon cx \quad (2.4)$$

Transmitance (propustnost) je definovaná jako poměr intenzity záření prošlého látkou ku počáteční hodnotě intenzity:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.5)$$

Lambert-Beerův zákon lze pak pomocí transmitance přepsat jako:

$$T = 10^{-c\varepsilon x} \quad (2.6)$$

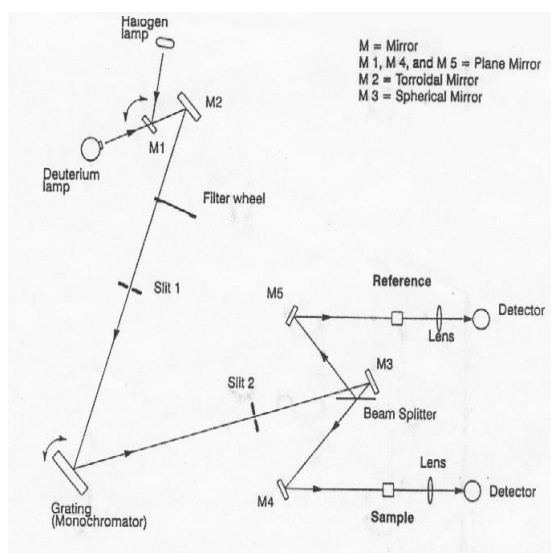
Kapitola 3

Experiment

3.1. Přístroje a zařízení

3.1.1 Spektrometr

Všechna měření byla provedena na spektrometru Lambda 12 firmy Perkin-Elmer. Jedná se o dvojpaprskový absorpční spektrometr. Jednou ze základních částí spektrometru jsou zdroje světla, žárovka pro viditelné spektrum a deuteriová výbojka pro UV záření. Z jejich záření je izolováno záření určité vlnové délky pomocí mřížkového monochromátoru. Poté je pomocí děliče paprsků svazek rozdělen na dvě části, kde jedna část je vedena vzorkem a druhá referencí. Po průchodu záření dopadne na detektory, kde je zaznamenáno. Signál je dále zpracován pomocí programu Lambda12.



Obrázek 3.1 Schéma spektrometru Lambda12

K měření byly vybrány křemenné kyvety značky Hellma, které měly z nabízených nejvyšší propustnost záření v požadovaném oboru spektra:

$T = (83,8 - 85,5)\%$ v rozmezí 233nm až 285nm (odpovídá pološířce prvního absorpčního píku nukleových kyselin).

Tloušťka používaných kyvet byla $x = 1\text{cm}$.

3.1.2 pH metr

Byl používán pH metr Orion PerpHect LogRmeter model 350 firmy Thermo. Potenciometrické stanovení pH spočívá v měření rozdílu potenciálů dvou elektrod. První elektroda je referenční, její potenciál je stálý a dobře reprodukovatelný. Druhá elektroda je indikační. Její potenciál je závislý na podmínkách prostředí.

Náš pH metr používal skleněnou (kombinovanou) elektrodu, která má zabudovanu vnitřní referenční elektrodu. Uvnitř elektrody je tlumivý roztok o známé hodnotě pH. Ponořením do měřeného roztoku pak vznikne potenciálový rozdíl, který je mírou pH. Potenciálový rozdíl vzniká mezi vnitřní stěnou elektrody, která je ve styku s tlumivým roztokem, a vnější stěnou, která je ve styku s měřeným roztokem. Měření je pak provedeno pomocí vnitřní referenční elektrody zabudované uvnitř elektrody a vnější referenční elektrody.

Nejprve bylo nutné pH metr okalibrovat, to jsem prováděla trojbodově pomocí kalibračních roztoků pro pH=4, pH=7 a pH=10. Měřené hodnoty pH byly odečítané z displeje po ustálení hodnot.

3.2 Vzorky

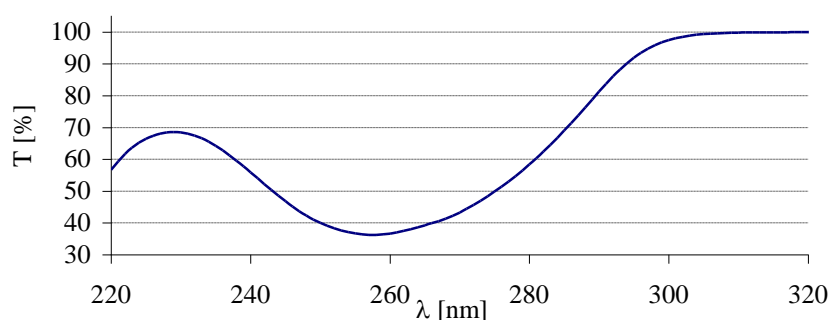
3.2.1. Oligonukleotid

Pro měření byl vybrán DNA oligonukleotid o délce 9nukleotidů o sekvenci 5' GTG ATA TGC. Oligonukleotid označený Kompl9 byl zakázkově nasyntetizován a přečištěn v LMFR Masarykovy Univerzity v Brně. Kód výrobce 976, dodané množství 33 μ g.

Extinkční koeficient udávaný výrobcem: $\epsilon = 89,6 \cdot 10^{-3} \text{ litr}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$

Typický průběh transmittance roztoku tohoto oligonukleotidu je zobrazen na obrázku 3.2.

Obrázek 3.2.: Tvar křivky transmittance vzorku KOMPL9



3.2.2. Pufř

Připravila jsem fosfátový pufř $pH = 7$ s doplňkem sodíkových kationtů jako směsný vodný roztok obsahující 20mM Na_2HPO_4 , 20mM NaH_2PO_4 a 100mM $NaCl$. Tento pufř jsem používala k přípravě všech roztoků oligonukleotidu vyjma případu měření závislosti na pH, kde jsem použila jen roztok 100mM $NaCl$.

Pufř dobře propouští UV záření, jeho transmittance byla $T = 99,2\%$ při vlnové délce 258nm.

Kapitola 4

Výsledky měření

Bylo provedeno několik sérií měření, jejichž cílem bylo ověřit a vyhodnotit jednotlivé vlivy, které se uplatňují při absorpčním stanovení koncentrace oligonukleotidu. Jednalo se o vliv samotného spektrometru, dále vliv manipulace s kyvetou, ředění vzorku a dále vlivy podmínek, za kterých měření probíhalo (koncentrace solí, pH, teplota).

4.1. Spektrometr

4.1.1 Přesnost stanovení propustnosti

První série měření se týkala přesnosti samotného spektrometru. Byla ověřována chyba nuly a 100% propustnosti.

Měření chyby 0 σ_{0T} jsem provedla po kalibračním měření s volnou vzorkovou i referenční dráhou. Detektor ve vzorkové dráze byl zacloněn, takže přístroj v tento okamžik neměl detekovat žádné záření a hodnota transmitance měla být nulová.

Poté jsem zjistila chybu 100% spektrometru σ_{100T} , kdy byl záření ponechán volný průchod. Transmitance měla být teoreticky stoprocentní.

Měření bylo provedeno v obou případech dvakrát. Výsledné chyby se pak počítaly jako průměrná hodnota odchylek od teoretické hodnoty, tedy 0% a 100%. Zjištěné chyby spektrometru v rozmezí 233nm až 285nm (odpovídající pološířce prvního absorpčního píku nukleových kyselin) jsou:

$$\begin{aligned}\sigma_{0T} &= 0,013\% \\ \sigma_{100T} &= 0,010\%\end{aligned}$$

4.1.2 Ověření stability spektrometru v čase

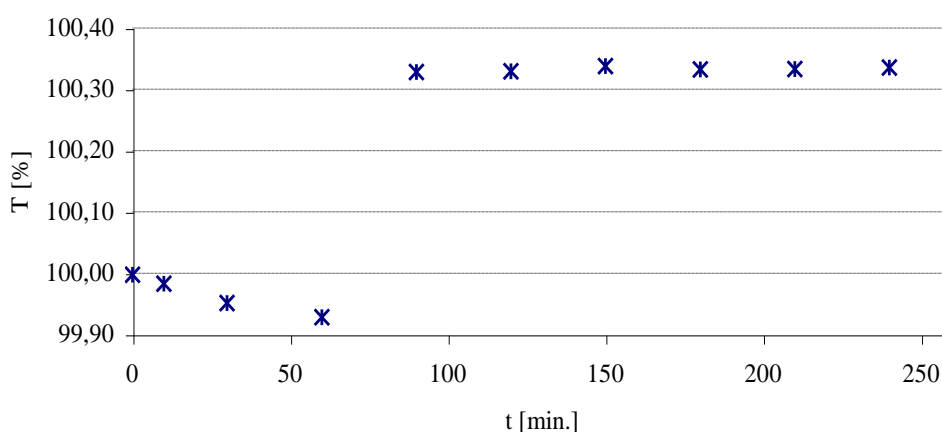
Stabilitu spektrometru v čase bylo nutno ověřit, neboť u některých měření (např. chyba ředění vzorku) byla kalibrace provedena jen na úplném počátku série měření.

Měřila jsem stabilitu spektrometru v intervalu čtyř hodin a to tak, že jsem po půl hodině opakovala měření chyby 100% transmitance. Chyby σ_{100T} byly počítány jako průměrné hodnoty z odchylek transmitance od 100% v rozmezí 233nm až 285nm. Zjistila jsem, že přístroj prvních 90 minut po zapnutí byl poměrně stabilní, hodnota transmitance postupně klesla o 0,07%, ale pak došlo ke skoku transmitance o 0,4%. Následující 2,5 hodiny byl přístroj opět stabilní

$$\sigma_{100T} = 0,004\%$$

Průměrné hodnoty transmitance v závislosti na čase jsou nakreslené na obrázku 4.1.

Obrázek 4.1.: Stabilita spektrometru v čase



Po zapnutí přístroje se výbojka začíná zahřívat. Pozorovaný skok po devadesáti minutách může být způsoben tím, že během zahřívání výbojky na pracovní teplotu dojde ke skokové změně v prostorovém rozložení výboje, což vede k mírné změně rozdělení intenzit mezi referenční a vzorkovou dráhu. Je patrné, že po zahřátí na tuto pracovní teplotu bylo již její vyzařování s menšími výkyvy (zhruba o řád).

4.1.3 Shrnutí vlivu spektrometru

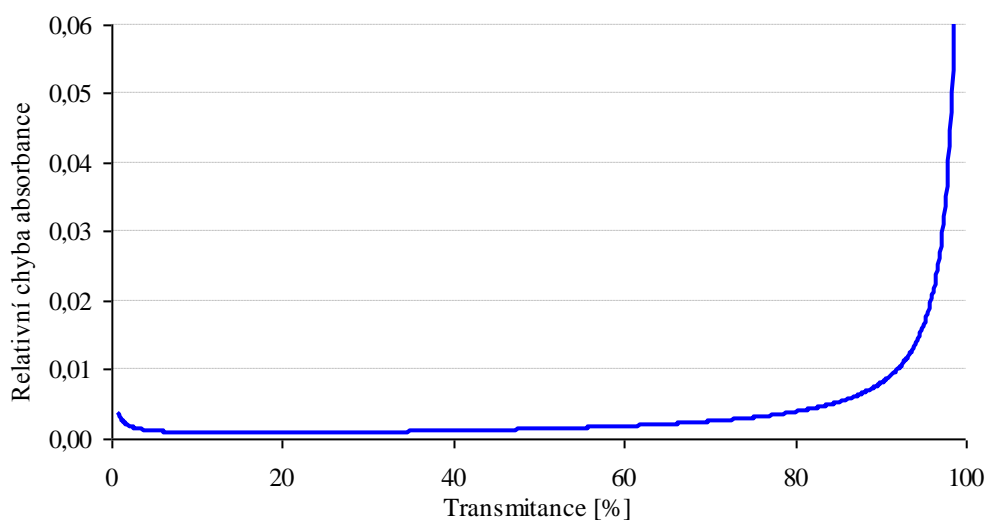
Na základě provedených měření lze konstatovat, že u daného spektrometru lze počítat s chybou nuly přibližně 0,013% a s chybou 100% při delším měření do 0,07%. Při skutečné transmitanci T bude tedy chyba v jejím určení daná přesností přístroje

$$\sigma_T = 0,07T + 0,013$$

To znamená, že například vzorek o transmitanci 10% jí bude mít změřenou s chybou $\pm 0,02\%$. Relativní chyba absorbance způsobená přístrojem bude tedy v závislosti na transmitanci měřeného vzorku mít hodnoty uvedené na obrázku 4.2.

Určité nebezpečí znamená možnost skoku 100% úrovně během několikahodinového zahřívání výbojky. Aby se předešlo nebezpečí takto vzniklých chyb měření, doporučuji nechat přístroj dostatečně dlouho zapnutý (zde stačí 90minut) před kalibrací a následným měřením; kalibrace by měla být provedena v co nejkratším čase před měřením.

Obrázek 4.2.: Relativní chyba absorbance spektrometru



4.2. Vliv manipulace s kyvetou

Bylo provedeno devět opakovaných měření transmittance prázdné kyvety při 260nm. Nejprve jsem provedla kalibraci spektrometru se dvěma čistými kyvetami. Mezi jednotlivými měřeními byla vzorková kyveta vždy naplněna pufrem, vyprázdněna, vmyta vodou a denaturovaným etanolem a vysušena suchým vzduchem z bombičky. Vnější stěny kyvety byly umyty vodou, etanolem, přešetřeny tamponem, poté znovu umyty etanolem a vysušeny vzduchem z bombičky. S referenční kyvetou nebylo během měření manipulováno. Pomocí těchto měření jsem zjistila, že chyba transmittance, která může vzniknout při mytí kyvety je:

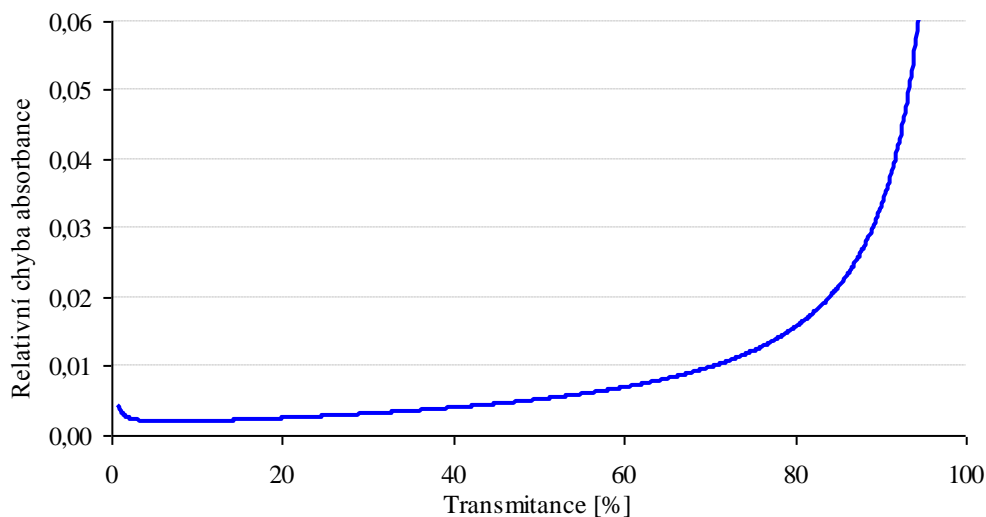
$$\sigma_{TK} = 0,333\%$$

Chyba byla spočtena jako průměr hodnot odchylek od kalibrace v bodě 258nm (bod absorpčního píku nukleových kyselin).

Při uvážení této chyby dostaneme závislost relativní chyby absorbance na transmittanci vzorku podle obrázku 4.3.

Je zřejmé, že s výjimkou skoku v úrovni 100% signálu vnáší způsob mytí kyvet podstatně větší chyby než chyby vlastního spektrometru.

Obrázek 4.3.: Relativní chyba absorbance při uvážení chyby mytí kyvety



4.3. Roztok oligonukleotidu

4.3.1. Chyba ředění

Provedla jsem deset měření transmitance. Vzorek jsem ředila různým způsobem na stejnou koncentraci. Postupy které jsem použila a výsledky měření transmitance jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Použit byl zásobní roztok KOMPL9 v pufru o koncentraci $c_V = 1,08 \text{ mM}$, který byl ředěn na jednotlivé vzorky. U většiny měření se jednalo o postupné dvojí ředění. Tato ředění byla provedena pomocí automatických pipet, jednalo se o pipety: 1000 μl , 200 μl , 20 μl .

Ve sloupci ředění 1 je uvedeno množství vzorku V_V o koncentraci c_V , a množství pufru V_P (viz 3.2.2) které jsem pro toto měření použila. Ve sloupci ředění 2 je pak uvedeno množství vzorku naředěného předchozím způsobem V_{RI} , který byl dále ředěn puftrem V_P . Tento sloupec obsahuje ještě informaci o naměřené absorbanci v 258nm A_{EXP} (bod absorpčního píku nukleových kyselin).

Tabulka 4.1.: Chyba ředění

číslo měření	Ředění 1		Ředění 2		A_{EXP}
	V_V [μl]	V_P [μl]	V_{RI} [μl]	V_P [μl]	
1	30	3000	1536	1464	0,465
2	30	3000	1536	1464	0,452
3	65	12748	-	-	0,478
4	65	12748	-	-	0,455
5	50	4000	1234	1770	0,468
6	50	4000	1234	1770	0,479
7	40	4000	1500	1430	0,491
8	40	4000	1500	1430	0,441
9	50	3000	920	2055	0,449
10	50	3000	920	2055	0,437

Pomocí deseti měření jsme zjistili průměrnou hodnotu absorbance a její směrodatnou odchylku. Po dosazení absorbance do Lambert-Beerova zákona (2.4) jsme pak vypočítali koncentraci za použití extinkčního koeficientu udaného výrobcem.

$$A = 0,462 \pm 0,017$$

$$c = (5,15 \pm 0,19) \mu\text{M}$$

Na základě těchto měření lze odhadnout, že nepřesnosti v ředění roztoku vedou k relativní chybě v určené koncentraci

$$\sigma_{CR} = 3,6\%$$

4.3.2. Závislost na koncentraci solí v roztoku

Zkoumala jsem, zdali absorpce oligonukleotidů může být ovlivněna koncentrací soli v roztoku. Měření byla provedena při základní koncentraci $c_{NaCl}=100mM$ a při koncentracích výrazně odlišných (41 a 500mM).

Oligonukleotidy jsem ředila vždy na stejnou koncentraci. Výsledky měření jsou zobrazeny v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2.: Závislost transmitance na koncentraci NaCl

c_{NaCl} [mM]	41	250	500
T [%]	33,53	33,02	33,42
c_{kompl9} [μ M]	5,30	5,37	5,31

Hodnota c_{kompl9} v tabulce je dopočtena z transmitance za použití vzorce (2.6). Z tabulky je patrné, že koncentrace solí nemá na transmitanci oligonukleotidů pozorovatelný vliv, protože kolísání naměřených hodnot je v mezích daných chybami způsobenými opakovaným mytím kyvety a chybou ředění. Rovněž není zde vidět žádná systematická změna určené koncentrace se vzrůstající koncentrací solí.

4.3.3. Závislost na pH

Dále nás zajímalo, jak bude oligonukleotid absorbovat při různých hodnotách pH. Ostatní měření byla prováděna při neutrálním pH a tak nás zajímaly případné změny absorbance při pH kyseljším a zásaditějším. Vzorek byl ředěn 100mM roztokem NaCl a pH upravované přidávkem roztoků NaOH a HCl.

Výsledky měření jsou spolu s teoretickými hodnotami a jejich odchylkou zachyceny v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3.: Závislost na pH

	Roztok 1	Roztok 2	Roztok 3
pH ⁽¹⁾	7,02	4,50	9,53
pH ⁽²⁾	7,01	4,78	9,44
T_{exp} [%]	33,26	38,58	34,15
c_{exp} [μ M]	5,34	4,62	5,21
T_{teor} [%]	-	38,07	34,29
c_{teor} [μ M]	-	4,68	5,19
ΔT [%]	-	-0,50	0,15
Δc [μ M]	-	0,06	-0,02

Hodnotu pH jsem u každého roztoku měřila dvakrát, před - $pH^{(1)}$ a po - $pH^{(2)}$ měření transmitance. Protože pH nebylo stabilizované pufrem, mohlo dojít k jeho změně při přendávání z nádoby, ve které se měřilo pH do kyvety, nebo během absorpčního měření.

Z naměřené transmitance T_{exp} byla pomocí vzorce (2.6) dopočtena koncentrace oligonukleotidů c_{exp} .

Roztok 2 resp. roztok 3 byl připraven přidáním HCl resp. NaOH do roztoku 1. Z hodnoty koncentrace zjištěné u roztoku 1 byly pak podle přidávaného objemu

předpověděné hodnoty transmitance T_{teor} a koncentrace c_{teor} roztoků 2 a 3 pro případ, že by extinkční koeficient na pH nezávisel. Tabulka zachycuje rozdíly experimentálně zjištěných a teoretických hodnot ΔT a Δc .

Rozdíl mezi teoretickou a experimentální hodnotou byl u měření s vyšším pH v rámci chyby mytí kyvety. Naším měřením jsme zde tedy neprokázali vliv pH na absorbanci oligonukleotidů.

U měření s nižším pH došlo k poklesu koncentrace c_{exp} , které fakticky znamenalo snížení extinkčního koeficientu o 1,5%, což je chyba větší než chyba vzniklá mytím kyvety. Chyba ředění je zde zanedbatelná, neboť se pracovalo se stejným vzorkem, který byl jen doředěn kyselinou. Došlo zde tedy se snížením pH na hodnotu 4,5 k mírnému poklesu extinkčního koeficientu.

Celkově lze však konstatovat, že pro měření s pH mezi hodnotami 6 a 8, není třeba uvažovat vliv konkrétní hodnoty pH na určovanou koncentraci.

4.3.4. Závislost na teplotě

Dalo se očekávat, že absorbance oligonukleotidů bude záviset na teplotě. Pro zjištění možného vlivu teploty na určení koncentrace byla koncentrace vzorku zkoumána při několika teplotách blízkých pokojové teplotě.

Vzorek byl nejprve ochlazen na 15°C a pak pomalu zahříván až na 40°C, poté byl ochlazován zpět k 15°C. Cestou tam i zpět byla transmitance zaznamenána ve čtyřech teplotách. U každé bylo ponecháno zhruba 5 minut na ustálení teploty vzorku v kyvetě.

Teplota vzorku byla regulována pomocí termostatu. Vodní nádrž uvnitř termostatu byla zahřívána nebo ochlazována dle potřeby. Odtud byla voda vedena pomocí trubiček zapojených ve spektrometru k držákům kyvet, kde docházelo k ohřevu nebo chlazení vzorkové kyvety spolu s referenční. Voda byla zpětně odváděna do termostatu. Měření teploty vzorku přímo v kyvetě bylo prováděno pomocí speciálního teplotního čidla připojeného k termostatu. Kyvetu jsme vždy museli vyjmout ze spektrometru, otevřít, ponořit čidlo do vzorku, zkontrolovat teplotu na displeji termostatu, uzavřít kyvetu a poté ji vrátit zpět do spektrometru.

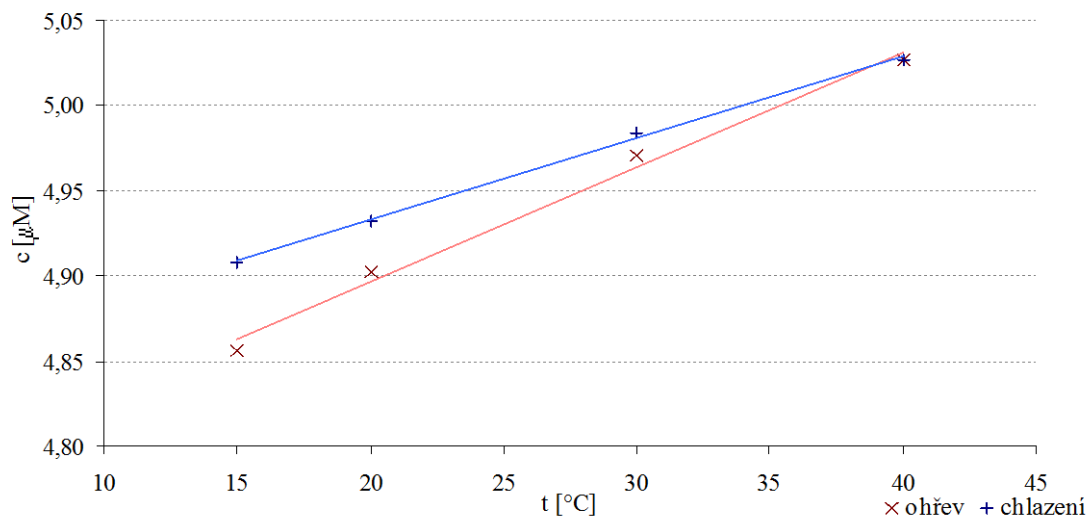
Takto jsme do vzorku mohli postupně zanášet nečistoty, proto byla hodnota naměřené transmitance opravena u každého měření o její rozdíl od 100% v 330nm, kde oligonukleotidy neabsorbují a pro vzorek bez nečistot je tedy transmitance 100 %. Hodnoty oprav transmitance byly v intervalu 0,08 až 0,45%.

Naměřené hodnoty spolu s koncentrací získanou pomocí vzorce (2.4) obsahuje tabulka 4.4., závislost koncentrace je zakreslena na obrázku 4.4, na obrázku 4.5 je pak znázorněno UV absorpční spektrum.

Tabulka 4.4.: Závislost na teplotě

t [°C]	15	20	30	40	30	20	15
A	0,435	0,439	0,445	0,450	0,447	0,442	0,440
c [μM]	4,856	4,902	4,971	5,027	4,984	4,932	4,908

Obrázek 4.4.: Teplotní závislost koncentrace určené za předpokladu konstantního extinkčního koeficientu. x označují hodnoty při ohřívání a + hodnoty při ochlazování vzorku.



S růstem teploty pozorujeme nárůst absorbance, což svědčí o narušování stohování bázi, které se zřejmě jako určitá tendence projevuje i u krátkých jednoduchých oligonukleotidových řetězců.

Zjištěné hodnoty koncentrace jsem proložila přímkami a zjistila tak jejich závislost na teplotě:

$$c = \alpha + \beta t$$

kde t je teplota ve °C. Parametry α a β jsou pro ohřev i chlazení odlišné. Tento rozdíl může souviset s určitou setrvačností stavu vzorku. Pro potvrzení tohoto jevu by však bylo nutné provést další experimenty. K základnímu odhadu vlivu teploty na přesnost měřené koncentrace jsme použili aritmetický průměr těchto parametrů.

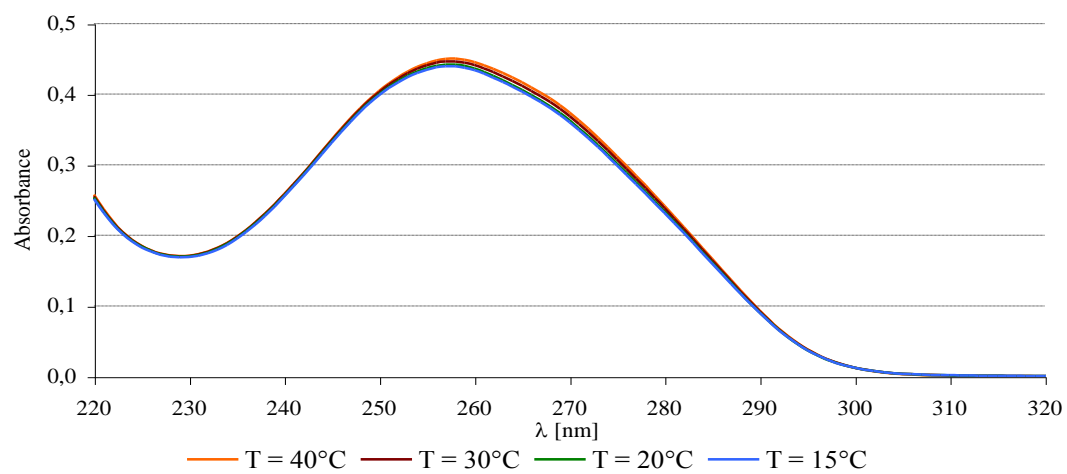
ohřev: $\alpha = 4,762 \mu M$	chlazení: $\alpha = 4,837 \mu M$	průměr $\alpha = 4,780 \mu M$
$\beta = 0,007 \mu M / ^\circ C$	$\beta = 0,005 \mu M / ^\circ C$	$\beta = 0,006 \mu M / ^\circ C$

Relativní chybu koncentrace způsobenou odchylkou teploty od 25°C lze pak zjistit pomocí vztahu:

$$\sigma_{c_i(25)} = \Delta t \beta / (\alpha + 25 \beta)$$

Pro teplotu 30°C je tedy relativní chyba koncentrace $\sigma_{c_{30}(25)} = 0,6\%$.

Obrázek 4.5.: UV absorpční spektrum oligonukleotidů měřené při různých teplotách



4.3.5 Shrnutí vlivu ředění vzorku a parametrů roztoku

Naše měření ukázala, že poměrně velkou chybu v určování koncentrací vnáší ředění vzorku, kterému lze připsat relativní chybu v určované koncentraci ve výši

$$\sigma_{CR} = 3,6\%$$

Naproti tomu se ukázalo, že absorpční spektra nejsou prakticky citlivá na změny koncentrace jednomocných iontů nebo změny pH. Pokud se tyto hodnoty budou držet v mezích řádově stovek mM jednomocných iontů a pH mezi 6 a 8, jsou absorpční spektra prakticky totožná.

S rostoucí teplotou extinkční koeficient prokazatelně roste. Velikost relativní chyby v určení koncentrace v závislosti na odchylce teploty vzorku Δt od požadované hodnoty t_0 lze u našeho modelového oligonukleotidu popsat vztahem:

$$\sigma_{Ct} = \Delta t \alpha / (\alpha + t_0 \beta) \quad (4.1.)$$

kde α a β jsou parametry určené v části viz 4.3.4. Při odchylce teploty od standardní o 5 °C bude chyba v určené koncentraci přibližně 0,6 %.

Kapitola 5

Porovnání doporučovaných metod určování extinkčního koeficientu

Přesnost určování koncentrací oligonukleotidů pomocí absorpčních měření závisí, vedle přesnosti v určení absorbance a přesnosti ředění vzorku, zásadním způsobem na použití správné hodnoty extinkčního koeficientu (EK). V odborné literatuře a především na některých webových stránkách se nabízejí návody nebo přímo kalkulátory umožňující určit velikost EK pro dané složení oligonukleotidu. Dalším úkolem mé práce bylo proto porovnání doporučovaných metod určení EK.

5.1. Metoda nejbližších sousedů

Jedna z možností, jak získat extinkční koeficient je pomocí metody nejbližších sousedů. Na internetu je několik firem, které mají na svých stránkách mimo svých produktů i kalkulátor, který tento koeficient po zadání sekvence vypočte.

5.1.1 Ambion Oligonucleotide MW and Extinction Coefficient Calculator

Ambion je firma specializující se na stabilizaci, syntézu a detekci RNA. Na svých stránkách [8] nabízí kalkulátor, pomocí kterého lze zjistit molekulární hmotnost a extinkční koeficient chemicky syntetizovaného DNA nebo RNA oligonukleotidu. Kalkulátor předpokládá, že oligonukleotid není fosforylovaný. Autoři ho nedoporučují pro dlouhé řetězce.

Otestovali jsme tento kalkulátor na našem oligonukleotidu. Po zadání sekvence 5'GTG ATA TGC a volbě typu DNA jsme získali:

$$\varepsilon = 89900 \text{ litr}/(\text{mol.cm})$$

Autoři se odvolávají na výpočet pomocí metody nejbližších sousedů, avšak není tu uveden žádný odkaz na jejich zdroje nebo použité tabulky.

5.1.2. Owczarzy

Richard Owczarzy, biofyzik zabývající se stabilitou, termodynamikou a kinetikou různých struktur NA na svých stránkách [9] tuto metodu označuje jako nejpřesnější. Průměrná chyba metody je podle něj 4%.

Jako své zdroje uvádí práce:

Cantor C.R., Warshaw M.M., Shapiro, H, Biopolymers, 9, 1059-1077 (1970), Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Volume 1: Nucleic Acids, Fasman, G.D. editor, page 589, 3rd edition, CRC Press, 1975.

Metoda nejbližších sousedů používá k výpočtu hodnoty extinkčních koeficientů monomerů a dimerů DNA. Vybrané tabelované hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.0.

Tabulka 5.0: Extinční koeficienty nukleotidů v 260 nm

Báze	ϵ_{260} [litr/mol.cm]
<i>pdA</i>	15400
<i>pdC</i>	7400
<i>pdG</i>	11500
<i>pdT</i>	8700
<i>dApdA</i>	27400
<i>dApdC</i>	21200
<i>dApdG</i>	25000
<i>dApdT</i>	22800
<i>dCpdA</i>	21200
<i>dCpdC</i>	14600
<i>dCpdG</i>	18000
<i>dCpdT</i>	15200
<i>dGpdA</i>	25200
<i>dGpdC</i>	17600
<i>dGpdG</i>	21600
<i>dGpdT</i>	20000
<i>dTpdA</i>	23400
<i>dTpdC</i>	16200
<i>dTpdG</i>	19000
<i>dTpdT</i>	16800

Výsledný EK oligonukleotidu při 260nm pak získáme součtem dílčích EK těchto „sousedů“ od kterého pak odečteme EK jednotlivých vnitřních bází. Hodnoty těchto EK jsou tabelovány pro záření o vlnové délce 260 nm, při 25°C a neutrálním pH pro single-strand.

Extinkční koeficient našeho oligonukleotidu 5'GTG ATA TGC pak získáme pomocí vzorce:

$$\epsilon_{dGTGATATGC} = \epsilon_{dGpdT} + \epsilon_{dTpdG} + \epsilon_{dGpdA} + \epsilon_{dApdT} + \epsilon_{dTpdA} + \epsilon_{dApdT} + \epsilon_{dTpdG} + \epsilon_{dGpdC} - 2\epsilon_{pdG} - 3\epsilon_{pdT} - 2\epsilon_{pdA}$$

$$\epsilon = 89900 \text{ litr}/(\text{mol.cm})$$

Pomocí tohoto vzorce a tabulky jsme tedy získali stejnou hodnotu EK, jako pomocí kalkulátoru firmy Ambion.

Owczarzy také pomáhal s vývojem on-line kalkulátorů pro Integrated DNA Technologies. Zkusili jsme jeho kalkulátor „OligoAnalyzer 3.0“ na jejich internetových stránkách [10]. Zjištěná hodnota extinkčního koeficientu byla stejná jako v předchozích případech.

5.1.3. Trilinkbiotech

Tuto metodu uvádí na svých stránkách i firma Trilinkbiotech zabývající se syntézou oligonukleotidů a jejich modifikacemi [11]. Na svých stránkách uvádí tabulky shodné s Owczarzyho. Nabízí nám také možnost stáhnout si jejich „oligo_calculator“.

5.2. Součet extinkčních koeficientů bází v oligonukleotidu

Tato metoda je o něco jednodušší než předchozí, neuvažuje se v ní vliv blízkých bází. Stačí pouze zadat počet adeninu, cytosinu, guaninu a thyminu v oligonukleotidu, jejich pořadí není podstatné.

Hodnotu extinkčního koeficientu pro náš oligonukleotid tedy získáme jako:

$$\varepsilon_{GTGATATGC} = \varepsilon_C + 2\varepsilon_A + 3\varepsilon_G + 3\varepsilon_T$$

5.2.1. Sigma-Aldrich

Tuto metodu jsem našla na stránkách Sigma-Aldrich, společnosti [12] zabývající se prodejem chemikálií, biotechnologiemi, materiály pro genový a farmaceutický výzkum, apod. Na svých stránkách uváděli tuto metodu spolu s předchozí. Používali je dále k výpočtu koncentrací, pro který byla nižší přesnost této metody přijatelná. Data, která měli k této metodě k dispozici, jsou uvedena v tabulce 5.2.

Tabulka 5.2.:Extinkční koeficienty nukleotidů v 260nm

Báze	A	C	G	T
ε [litr/(mol.cm)]	15400	7400	11500	8700

Pomocí této metody jsme získali $\varepsilon = 98800$ litr/(mol.cm)

5.2.2. Eva Freisinger

Další kdo na svých stránkách prezentoval tuto metodu byla Dr. Eva Freisinger, která působí na Univerzitě Zuerich v Institutu anorganické chemie. Na svých stránkách [13] bohužel nemá uvedeny žádné prameny, uvádí pouze hodnoty použitých EK viz tabulka 5.3.

Tabulka 5.3.:Extinkční koeficienty nukleotidů v 260nm

Báze	A	C	G	T
ε [litr/(mol.cm)]	15400	7400	11800	9600

Otestovali jsme nabízený „Oligo Extinction Coefficient Calculator“ na našem oligonukleotidu a získali:

$$\varepsilon = 102\,400 \text{ litr/(mol.cm)}$$

5.2.3. Genscript corporation

Na svých stránkách [14] rovněž nabízí výpočet pomocí jejich kalkulátoru „Oligo Calculator“. Data, která k tomu používají, jsou uvedena v tabulce 5.4.

Tabulka 5.4.:Extinkční koeficienty nukleotidů v 260nm

Báze	A	C	G	T
ε [litr/(mol.cm)]	15300	7400	11800	9300

Použitím jejich kalkulátoru získáme:

$$\varepsilon = 101\,300 \text{ litr/(mol.cm)}$$

5.3. Shrnutí k publikovaným výpočtům extinkčního koeficientu

Hodnoty extinkčního koeficientu získané pomocí různých zveřejněných postupů kolísají v rozmezí větším než 3 procenta, což představuje chybu, která je srovnatelná s chybou ředění $\sigma_{CR} = 3,6\%$.

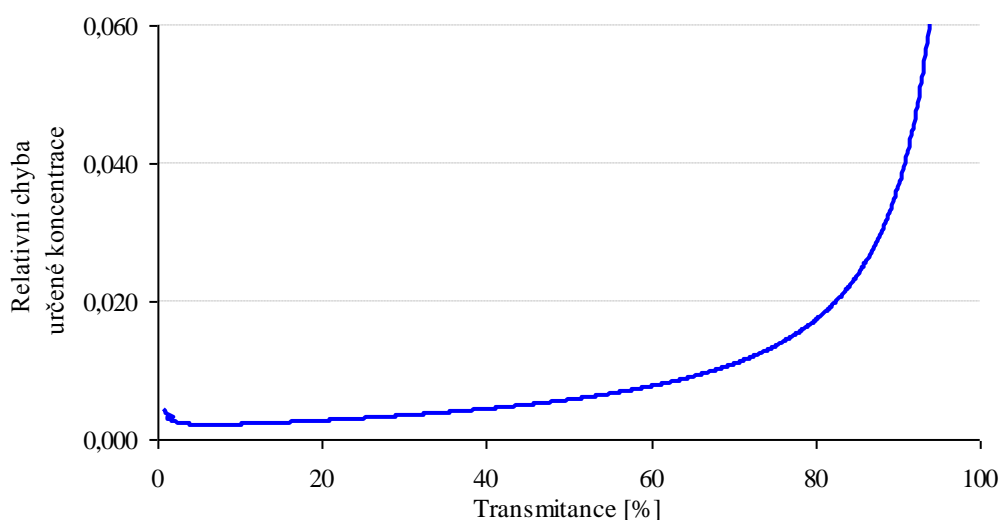
Určování na základě prostého bazového složení je zřejmě méně přesné; autoři používají různé hodnoty „dílků“ extinkčních koeficientů připsaných jednotlivým bázím, které jsou zřejmě volené tak, aby daly v některých konkrétních případech správné hodnoty EK. Metoda nejbližších sousedů představuje korektnější přístup. Neexistuje však hlubší studie, která by u široké skupiny oligonukleotidů ověřila, že tato metoda dává správné hodnoty EK. Přestože všechny webové kalkulátory používající tento přístup nám poskytly stejnou hodnotu, stojí za povšimnutí, že výrobce použitého oligonukleotidu udává hodnotu EK poněkud jinou.

Kapitola 6

Závěr

Provedené série měření prokázaly, že z experimentálních faktorů má na přesnost určení koncentrace oligonukleotidů z absorpčních měření největší vliv nepřesnost při ředění vzorku. Na dalším místě je vliv manipulace s kyvetou (mytí a sušení kyvety při změně rozpouštědla za vzorek). Dopad této chyby závisí na celkové transmitanci vzorku a její vhodnou volbou jej lze minimalizovat (viz obrázek 4.3.). Celkovou relativní chybu způsobenou experimentálními vlivy lze vystihnout závislostí na celkové transmitanci vzorku podle obrázku 6.1.

Obrázek 6.1.: Závislost celkové relativní chyby určené koncentrace



Z podmínek měření má největší vliv teplota vzorku. Při odchylce 5°C od referenční teploty 25°C může dojít ke zvýšení relativní chyby určované koncentrace o 0,6 % dle vzorce (4.1.)

Pro absolutní určení koncentrace má zásadní důležitost určení hodnoty extinkčního koeficientu. Zdá se, že rozumnou hodnotu extinkčního koeficientu by mohla poskytnout metoda nejbližších sousedů – ověření této metody by však vyžadovalo měření absorbance na sérii oligonukleotidů při možnosti určovat jejich koncentraci pomocí nezávislé metody.

Literatura

- [1] Prosser V. a kol.: *Experimentální metody biofyziky*, Academia, Praha 1989.
- [2] Palacký J.: *Spektroskopické studium nových modifikovaných oligonukleotidů*, Diplomová práce MFF UK, Praha 2005.
- [3] Vaisocherová H.: *Určování termodynamických charakteristik komplexů nukleových kyselin na základě analýzy teplotní závislosti UV absorpčních spekter*, Diplomová práce MFF UK, Praha 2002.
- [4] Saenger W.: *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York 1984
- [5] www.wikipedia.com, 15.5.2007, 15:00
- [6] <http://www.uochb.cas.cz>, 8.5.2007, 14:00
- [7] <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/absext.html>
- [8] http://www.ambion.com/techlib/misc/oligo_calculator.html, 10.5.2007, 14:00
- [9] <http://www.owczarzy.net/emethod.htm>, 10.5.2007, 14:00
- [10] <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>, 10.5.2007, 14:00
- [11] https://www.trilinkbiotech.com/tech/tech_data/ext_coeff_MW.pdf, 10.5.2007, 14:00
- [12] http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Sigma_Genosys 10.5.2007, 14:00
- [13] <http://www.eva-freisinger.de/sites/ext.html>, 10.5.2007, 14:00
- [14] http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer_calculation, 10.5.2007, 14:00
- [15] <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm>, 13.5.2007, 14:00