

Обнаружение контаминации РНК в препаратах ДНК млекопитающих

Использование передовых алгоритмов UV-Vis для улучшения специфичности

Введение

Количественное определение нуклеиновых кислот традиционно проводят путем определения УФ-поглощения при трех аналитических длинах волн: 230 нм, 260 нм и 280 нм. Информация, полученная в результате этих измерений оптической плотности, позволяет ученым измерять концентрацию нуклеиновых кислот и иметь показатель чистоты образца. Недостатком такого подхода является отсутствие конкретности. Таким образом, любое загрязняющее вещество, которое поглощает на этих длинах волн, приведет к неточностям в результатах определения концентрации нуклеиновой кислоты.

Thermo Scientific™ NanoDrop™ Один один с

Особенности спектрофотометра Thermo Scientific™ Acclaro™

Программное обеспечение Intelligence Technology, которое использует данные полного спектра и передовые алгоритмы для выявления распространенных загрязнителей нуклеиновых кислот и обеспечения скорректированных концентраций нуклеиновых кислот.

В этой технической заметке мы покажем, как недавно представленная функция в программном обеспечении Acclaro позволяет пользователям обнаруживать и корректировать загрязнение РНК в препаратах ДНК или загрязнение ДНК в препаратах РНК.

материалы и методы

ДНК и РНК получали из клеток HeLa, обрабатывали РНКазой или ДНКазой для удаления загрязняющих нуклеиновых кислот и подвергали диализу в буфере ТЕ, рН 8,0. Исходные концентрации определяли на спектрофотометре NanoDrop One против холостого опыта ТЕ. Были приготовлены различные смеси ДНК и РНК (как показано на рисунке 1), и на приборе были считаны три образца каждого образца. Для каждого повтора использовали свежую аликвоту соответствующей смеси объемом 2,0 мкл. Были рассчитаны следующие результаты концентрации ДНК:

- Теоретическая концентрация ДНК: скорректированный исходный уровень A260 * 50 нг / мкл * (% ДНК / 100).
- Концентрация нескорректированной ДНК: скорректированный исходный уровень A260 * 50 нг / мкл.
- Концентрация ДНК с поправкой на Acclaro: A260 с поправкой на Acclaro * 50 нг / мкл.

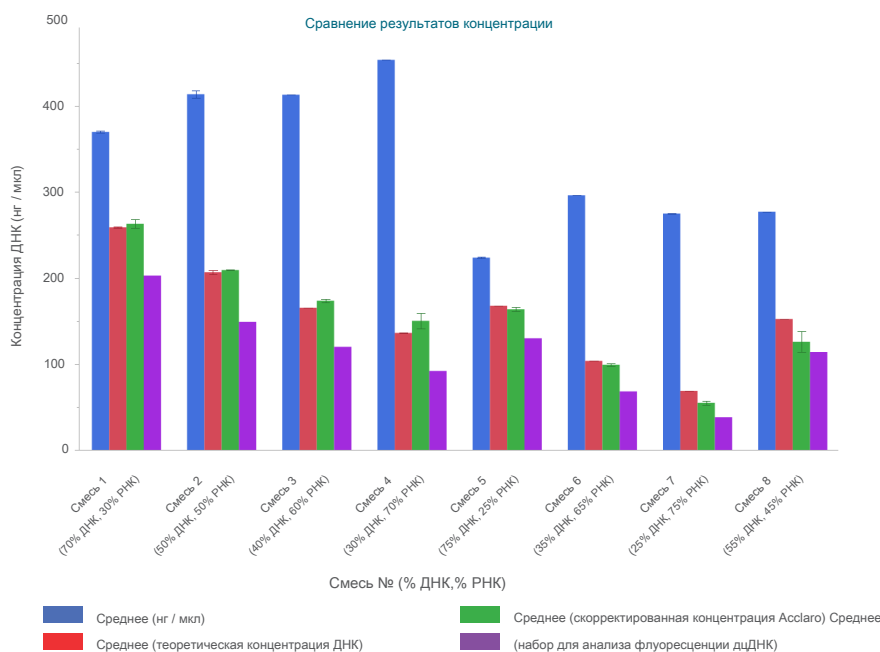


Рисунок 1: Гистограмма сравнивает результаты концентрации различных смесей ДНК и РНК с использованием разных подходов. Фиолетовые столбцы представляют данные, полученные с использованием набора для анализа дцДНК широкого диапазона. В этом анализе используется флуоресцентный краситель, который специфически связывает ДНК. Синие столбцы представляют данные, когда для расчета концентрации ДНК используется прямое поглощение A260. Красные столбцы представляют собой теоретические целевые концентрации ДНК. Зеленые полосы представляют концентрации ДНК, скорректированные Acclaro. Препараты ДНК и РНК, использованные для смесей ДНК / РНК, выделяли из клеток HeLa. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение от среднего.

Теоретические, нескорректированные и скорректированные по Asclargo концентрации ДНК сравнивали с концентрациями, полученными с помощью ДНК-специфического флуоресцентного анализа. Анализы флуоресценции выполняли с использованием набора для анализа дцДНК широкого диапазона и флуоресцентного прибора. Стандартная кривая была построена в соответствии с протоколом набора для анализа. Для этого анализа стандарты готовили путем добавления 10 мкл соответствующего стандарта ДНК к 200 мкл рабочего раствора. Затем готовили образцы нуклеиновой кислоты, добавляя 2,0 мкл образца к 200 мкл рабочего раствора. Стандарты ДНК и образцы инкубировали при комнатной температуре в течение

5 минут, а затем считайте на флуоресцентном приборе.

Средние концентрации ДНК и стандартные отклонения для каждого образца показаны на рисунке 1.

Полученные результаты

При расчете концентрации ДНК в присутствии загрязняющей РНК наибольшая степень неточности наблюдалась при использовании нескорректированного поглощения A260 для расчета концентрации ДНК. Обе макромолекулы (т.е. РНК и ДНК) поглощают свет с длиной волны 260 нм; поэтому использование оптической плотности при 260 нм для расчета концентрации ДНК может привести к завышению фактической концентрации ДНК в образце.

Результаты, скорректированные с помощью Asclargo (зеленые столбцы), демонстрируют, что большая точность достигается при определении концентрации ДНК при использовании функции Asclargo. Алгоритм Asclargo использует полные спектральные данные в сочетании с многомерной математикой для конкретного определения концентрации ДНК в смеси ДНК / РНК. Концентрации ДНК, полученные после коррекции Asclargo, были намного ближе к концентрациям, полученным с использованием ДНК-специфического флуоресцентного красителя.



Спектрофотометр NanoDrop One

Заключение

Загрязнение РНК в препаратах геномной ДНК - распространенная проблема в рабочих процессах молекулярной биологии. При измерении образцов с помощью традиционной спектрометрии совместно очищенная РНК искусственно увеличивает концентрацию ДНК. Хотя использование специфических ДНК-связывающих красителей может обеспечить более точное определение концентрации ДНК, чем поглощение при

260 нм, загрязнение образца ДНК очищенной РНК может иметь неблагоприятные последствия для современных геномных рабочих процессов.

Мы продемонстрировали, что, используя полные спектральные данные и многомерные математические алгоритмы, исследователи могут преодолеть недостатки обоих упомянутых типов анализов. Программное обеспечение Asclargo, которое запускает спектрофотометр Nanodrop One, позволяет идентифицировать загрязнение РНК в образце ДНК и предоставляет скорректированный результат концентрации. Эти два фактора позволят молекулярным биологам быстро устранять затруднения при экстракции и улучшать последующие результаты.

000 «Диаэм»

Москва

ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург
+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск
+7(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж
+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола
+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск
+7(923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань
+7(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург
+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово
+7 (923) 158-6753
kemerovo@dia-m.ru

Армения
+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

