

DOLOČEVANJE KONCENTRACIJE mRNK

Raziskovalno področje: Kemija

Raziskovalna naloga

Avtorica: Sibila Mežnar

Dijakinja 2. letnika

Mentor: dr. Martin Tine Perger
Somentor: dr. Anže Martinčič Celjar

2025

Škofijska klasična gimnazija

Kazalo

1	Kazalo grafov	3
2	Kazalo tabel	4
3	Kazalo slik.....	4
4	Slovar izrazov	5
5	Povzetek	6
6	Uvod.....	7
7	Teoretični del.....	8
7.1	Molekula DNK	8
7.2	Transkripcija	8
7.3	Molekula RNK	9
7.4	In vitro transkripcija	11
7.5	Vrste mRNK	11
7.5.1	mFix4	11
7.5.2	eGFP.....	12
7.5.3	saRNK.....	12
7.6	Metode	12
7.6.1	HPLC.....	12
7.6.2	Spektroskopija.....	16
7.6.3	Beer-Lambertov zakon.....	17
7.7	Aparature	18
7.7.1	HPLC.....	18
7.7.2	Spektrofotometer.....	18
8	Eksperimentalni del.....	20
8.1	Priprava vzorcev.....	20
8.1.1	Redčenje	20
8.1.2	Razgradnja/hidroliza mRNK.....	20

8.2	Merjenje	21
8.2.1	Merjenje na spektrofotometru.....	21
8.2.2	Merjenje na HPLC.....	22
8.2.3	Računanje s pomočjo mRNACalc.....	23
8.2.4	Določanje koncentracije na 3 načine.....	24
9	Rezultati.....	25
9.1	Primerjava koeficientov	25
9.1.1	Spektrofotometer.....	25
9.1.2	HPLC.....	32
9.2	Primerjava koncentracij.....	36
9.3	Razgradnja mRNK s hidrolizo	37
10	Razprava in zaključek.....	39
10.1	Ovrednotenje hipotez	39
11	Literatura.....	41

1 Kazalo grafov

Graf 1: Meritve vseh treh vrst molekul na Thermo Fisher spektrofotometru	26
Graf 2: Meritev mFix4 na Thermo Fisher spektrofotometru	26
Graf 3: Meritev eGFP na Thermo Fisher spektrofotometru.....	27
Graf 4: Meritev saRNK na Thermo Fisher spektrofotometru.....	27
Graf 5: Meritve vseh treh vrst molekul na IMPLEN NP80 spektrofotometru	28
Graf 6: Meritev mFix4 na IMPLEN NP80 spektrofotometru	28
Graf 7: Meritev eGFP na IMPLEN NP80 spektrofotometru.....	29
Graf 8: Meritev saRNK na IMPLEN NP80 spektrofotometru.....	29
Graf 9: Meritve vseh treh vrst molekul na IMPLEN NP80 spektrofotometru (v kiveti).....	30
Graf 10: Meritev mFix4 na IMPLEN NP80 spektrofotometru (v kiveti).....	30
Graf 11: Meritev eGFP na IMPLEN NP80 spektrofotometru (v kiveti).....	31
Graf 12: Meritev saRNK na IMPLEN NP80 spektrofotometru (v kiveti)	31

Graf 13: Meritve vseh treh vrst molekul na HPLC z Oligo dT kolono	32
Graf 14: Meritev mFix4 na HPLC z Oligo dT kolono	32
Graf 15: Meritev eGFP na HPLC z Oligo dT kolono	33
Graf 16: Meritev saRNK na HPLC z Oligo dT kolono	33
Graf 17: Meritve vseh treh vrst molekul na HPLC z CIMac PrimaS kolono	34
Graf 18: Meritev mFix4 na HPLC s CIMac PrimaS kolono	34
Graf 19: Meritev eGFP na HPLC s CIMac PrimaS kolono	35
Graf 20: Meritev saRNK na HPLC s CIMac PrimaS kolono	35

2 Kazalo tabel

Tabela 1: Začetne koncentracije vzorcev mRNK	24
Tabela 2: Izmerjene absorbance in površina pod vrhom za eGFP, ki ni vsebovala vzorca	26
Tabela 3: Primerjava koeficientov premic na grafih	31
Tabela 4: Primerjava koeficientov premic na grafih	36
Tabela 5: Izmerjene koncentracije v primerjavi s koncentracijami, določenimi pri redčenju	36
Tabela 6: Odstopanje koncentracije, predpostavljene pri redčenju, od koncentracije, zmerjene na spektrofotometrih	37
Tabela 7: Koncentracije, določene z UV-Vis spektrofotometrom (začetne koncentracije vzorcev pred redčenjem)	37
Tabela 8: Koncentracije, določene z meritvijo koncentracij redčenih vzorcev na spektrometru in nato računanje z redčitvenimi koeficienti	37
Tabela 9: Koncentracije, določene z mRNACalc	37
Tabela 10: Primerjava razmerij med adeninom, gvaninom, citozinom in uracilom v mRNK	39

3 Kazalo slik

Slika 1: Molekula mRNK in njen nastanek	9
Slika 2: Shematičen prikaz tRNK	10
Slika 3: Shematičen prikaz HPLC sistema	15
Slika 4: Shematičen prikaz spektrofotometra	19

4 Slovar izrazov

A-mesto (aminoacilno mesto) je mesto na ribosomu, kjer se veže tRNK, ki prinaša novo aminokislino.

P-mesto (peptidilno mesto) je mesto na ribosomu, kjer se aminokislina na tRNK poveže v polipetidno verigo.

E-mesto (izstopno mesto) je mesto na ribosomu, kjer je molekula tRNK že oddala svojo aminokislino in zapusti ribosom.

Antikodon je zaporedje treh nukleotidov na tRNK, ki je komplementarno kodonu na mRNK.

Kodon je zaporedje treh nukleotidov, ki nosi zapis za eno aminokislino.

Hipokromnost je pojav, pri katerem molekula absorbira manj svetlobe, kot bi pričakovali na podlagi njenih posameznih komponent.

pDNK (plazmidna DNK) je krožna, dvovijačna molekula DNK, ki se nahaja v bakterijah in nekaterih evkariontskih celicah.

Poliadenilirane mRNK je molekula mRNK, ki ima na svojem 3'-koncu dodan poli(A) rep (zaporedje več adeninskih (A) nukleotidov).

Ligand je molekula, ki je vezana na stacionarno fazo. Uporabljen je za specifično interakcijo z vzorcem, kar omogoči selektivno ločevanje različnih komponent v vzorcu.

Monokromator je filter, mreža ali prizma, ki prepušča svetlobo določene valovne dolžine.

Bimodalna kolona deluje na dva načina vezave, običajno ionska izmenjava in hidrofobne interakcije (lahko pa tudi druge kombinacije), kar poveča njeno selektivnost ali vsestranskost.

Pirofosfat je fosforjev oksianion, ki vsebujejo dva fosforjeva atoma, ki sta povezana preko kisika.

5 Povzetek

V raziskovalni nalogi sem preučevala točnost ekstinkcijskega koeficienta za mRNK, ki je podan v literaturi. Ekstinkcijski koeficient je ključni parameter pri kvantifikaciji nukleinskih kislin z UV-spektrofotometrijo, saj omogoča izračun koncentracije na podlagi absorbance pri določeni valovni dolžini. Kljub široki uporabi standardnih vrednosti v znanstveni literaturi pa se pojavljajo pomisleki glede njihove zanesljivosti in ponovljivosti v različnih eksperimentalnih pogojih.

V okviru raziskave sem analizirala literaturo ter primerjala eksperimentalno izmerjene ekstinkcijske koeficiente s teoretično pričakovanimi vrednostmi. Uporabila sem spektrofotometrične meritve in statistične metode za oceno odstopanj. Poseben poudarek je bil na vplivu sekundarne strukture mRNK na optične lastnosti vzorcev.

V zadnjih letih je mRNK postala ključna molekula v biomedicinskih raziskavah, predvsem zaradi njene uporabe v cepivih in genski terapiji. Zaradi njene vse širše uporabe je natančna kvantifikacija mRNK nujna za zagotavljanje zanesljivih rezultatov v znanstvenih in medicinskih aplikacijah. Rezultati raziskave so pokazali, da lahko ekstinkcijski koeficient mRNK v določenih eksperimentalnih pogojih odstopa od referenčnih vrednosti v literaturi, kar poudarja potrebo po skrbni kalibraciji in prilagoditvi koeficienta specifičnim eksperimentalnim pogojem.

6 Uvod

Namen raziskovalne naloge je bil, da na podlagi opravljenih različnih meritev in obdelanih rezultatov dobim odgovor na vprašanje, kako točen je ekstinkcijski koeficient za molekule mRNK, ki je podan v literaturi.

Hipoteza 1, oblikovana na podlagi članka *The mRNACalc webserver accounts for the N1-methylpseudouridine hypochromicity to enable precise nucleoside-modified mRNA quantification* [1], je bila, da lahko ekstinkcijski koeficient, ki je podan v literaturi ($\epsilon_{260} = 40 \text{ } (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ na enoto absorbance), glede na specifično vrsto mRNK, odstopa za 10–20 %.

Ta razpon napake morda zadostuje za oceno odmerjenega odziva pri terapevtskih mRNK v celičnih ali in vitro eksperimentih (izven celičnih), vendar bi bila natančnejša določitev koncentracij koristna za razvoj tehnologij mRNK. Še posebej skrb vzbujajo meritve samopodvojevalnih RNK (saRNK) in nukleozidno modificiranih mRNK. Logaritemsko povečanje samopodvojevalnih RNK (saRNK) lahko spremeni 20-odstotno sprejeto napako v koncentraciji RNK v večkratne razlike. Kemične modifikacije na nukleobazah mRNK lahko prav tako povzročijo pomembne spremembe v ekstinkcijskem koeficientu mRNK, kar otežuje natančno kvantifikacijo koncentracij nukleozidno modificiranih mRNK.

Za izboljšanje natančnosti kvantifikacije mRNK se mRNK molekule pred določanjem UV-absorpcije lahko hidrolizirajo s kombinacijo toplotne in alkalne hidrolize. Hipokromno zvito stanje mRNK se s hidrolizo spremeni v hiperkromno stanje enojnih monofosfatnih nukleotidov. Ker so natančni ekstinkcijski koeficienti štirih standardnih nukleotidov v vodni puferski raztopini znani, lahko ekstinkcijski koeficient hidrolizirane mRNK izračunamo kot vsoto ekstinkcijskih koeficientov njenih nukleotidnih sestavin. Tako lahko ob določitvi absorbance pri 260 nm koncentracijo mRNK kvantificiramo s približno 4 % napako s pomočjo teh metod. [1]

Hipoteza 2, ki se nanaša na metodi, ki sem ju izbrala za opravljanje meritev, pa je, da lahko z različnima načinoma merjenja (preko HPLC in UV-Vis spektrofotometra) dobim primerljive rezultate.

7 Teoretični del

7.1 Molekula DNK

DNK je okrajšava za slovensko poimenovanje molekule: **deoksiribonukleinska kislina**, angleško DNA: **deoxyribonucleic acid**. Je linearni polimer, sestavljen iz štirih različnih nukleotidov – monomerov. Vsak nukleotid sestavljajo trije deli: sladkor (deoksiriboza, po kateri molekula tudi nosi ime), fosfatna skupina in dušikova baza (adenin (A), timin (T), citozin (C), gvanin (G)). Ogrodje verige DNK tvorita ponavljajoči se fosfatna skupina in sladkor (deoksiriboza), tretji gradnik nukleotida, dušikova baza, pa je vezan na sladkor in ni del ogrodja – zaporedje baz v molekuli DNK predstavlja genetsko informacijo (navodila za sintezo beljakovin, v katero so vključene še mnoge druge biomolekule). DNK je sestavljena iz dveh takih verig, in sicer zaradi tvorjenja specifičnih parov med bazami, ki jih stabilizirajo vodikove vezi med njimi (dvojne ali trojne). Velja, da adenin vedno tvori dvojno vodikovo vez s timinom in citozin vedno tvori trojno vez z gvaninom. Vodikove vezi niso zelo močne, zato se lahko hitro prekinejo za potrebe biokemijskih procesov (npr.: prevajanja), vendar pa so dovolj močne, da molekuli zagotavljajo stabilnost. Stabilna struktura molekule DNK je poimenovana dvojna vijačnica. Glavna naloga molekule DNK je torej shranjevanje zapisa za nastanek beljakovin, ki pa se nato prenese na molekule RNK v procesu, ki ga imenujemo transkripcija.

7.2 Transkripcija

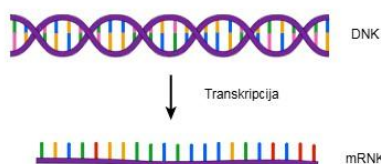
Transkripcija je proces, v katerem se s pomočjo encima RNK polimeraze dvojna vijačnica razvije in nastane enoverižna predloga za sintezo RNK. Encim RNK polimeraza prepozna posebna mesta na molekuli DNK, ki jih imenujemo promotorji. Običajno se nahajajo pred začetkom gena in te kratke sekvence nukleotidov določajo, kje se bo začela sinteza molekule RNK. Na proste dušikove baze na verigi DNK RNK polimeraza veže komplementarne dušikove baze in tako tvori molekulo RNK. Sinteza molekule RNK vedno poteka v smeri 5' proti 3'. Transkripcija se konča na mestu s tako sekvenco nukleotidov, da RNK polimeraza preneha s sintezo in se loči od DNK ter izloči RNK. Taka mesta imenujemo terminatorji. [2]

7.3 Molekula RNK

DNK in RNK imata enako zgradbo ogrodja molekule, le da v RNK nastopa sladkor riboza. Po njem molekula tudi nosi ime: **ribonukleinska kislina**, angleško RNA: **ribonucleic acid**. Riboza in deoksiriboza se razlikujeta v kisiku na 2. ogljikovem atomu, ki ga sladkor riboza ima, sladkor deoksiriboza pa ne (deoksi v grščini pomeni brez kisika). Tudi ena izmed pirimidinskih dušikovih baz je različna, in sicer za molekulo DNK je značilen timin (T), ki ga v molekuli RNK zamenja uracil (U).

Glede na funkcije, ki jih RNK opravlja v celici, jo delimo na tri skupine:

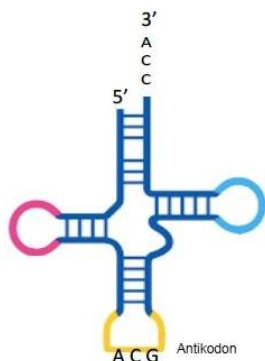
mRNK (ang. messenger RNA, slo. informacijska RNK) → je molekula, ki nastane ob transkripciji gena za protein. Na 5' konec se doda 5' kapica (ang. 5' cap), ki ščiti mRNK pred razgradnjo in pripomore k lažjemu prepoznavanju v ribosomu za začetek translacije. Na 3' konec pa se doda poli(A) rep (ang. poly(A) tail), ki prav tako ščiti RNK pred razgradnjo, pomaga pri izvozu molekule iz jedra v citoplazmo in pomaga, da se tvori kompleks z ribosomom. Končna naloga, ki jo molekula opravi pred razgradnjo, je translacija. To je biološki proces, pri katerem sodelujejo prav vse vrste RNK. mRNK se pritrdi na malo podenoto ribosoma, na veliko podenoto ribosoma pa prihajajo molekule tRNK in se premikajo po A, P in E delu. Aminokislina se vežejo v polipeptidno verigo in, ko se molekula mRNK premakne do stop kodona, se sinteza zaključi – izoblikuje se zaključena beljakovina.



Slika 1: Molekula mRNK in njen nastanek (Vir: [3])

tRNK (ang. transfer RNA, slo. prenašalna RNK) → je molekula RNK, ki transportira aminokislina v citoplazmi do ribosoma. Njena struktura je močno zaznamovana s tremi značilnimi zankami, zato je zanjo značilna tako imenovana deteljasta struktura. Na eni izmed zank, ki jo imenujemo tudi antikodonska zanka, je pritrjen antikodon (zaporedje treh nukleotidov, ki kodirajo zapis za eno aminokislino), ki je komplementaren določenemu kodonu na molekuli mRNK. Molekula tRNK vstopi v proces translacije na mestu A (aminoacilno mesto) v ribosomu, kjer se antikodon že poveže s komplementarnim kodonom na molekuli mRNK. Na mestu P (peptidilno mesto) se

aminokislina, ki je vezana na 3' konec tRNK, poveže v rastočo polipeptidno verigo. Na mestu E (izhodno mesto) molekula tRNK, po tem ko je že oddala aminokislino, zapusti ribosom.



Slika 2: Shematičen prikaz tRNK (Vir: [4])

rRNK (ang. ribosomal RNA, slo. ribosomska RNK) → je molekula RNK, ki je ključni sestavni del ribosomov, predstavlja kar 2/3 mase celotnega ribosoma. Skupaj z beljakovinami tvori malo in veliko podenoto ribosoma. Kot encim (ribocim) pa sodeluje tudi v translaciji, in sicer kot katalizator nastanka peptidne vezi med aminokislinami. [2]

Terapevtska mRNK

Terapevtska uporaba mRNK je sprožila velik optimizem pri razvoju novih cepiv in terapij proti številnim nalezljivim boleznim ali boleznim, za katere še ni zdravila. Tehnologija mRNK omogoča proizvodnjo antigenih, funkcionalnih in/ali terapevtskih proteinov z vnosom mRNK v človeško telo in celice. Ker mRNK deluje v citoplazmi, ne predstavlja tveganja za vključitev v genom gostiteljske celice. Najpomembneje je, da tehnologija mRNK omogoča hitro, stroškovno učinkovito in obsežno proizvodnjo, ki ne zahteva celičnih kultur ali živalskih materialov. Zato tehnologije mRNK olajšajo proizvodnjo in omogočajo hiter odziv na nove nalezljive bolezni, kar je bilo posebej poudarjeno pri hitri uvedbi mRNK cepiv proti COVID-19 po vsem svetu.

Vsi uspešni RNK terapevtiki imajo v celoti zamenjan uridin z N1-metilpsevdouridinom v molekulah mRNK, da preprečijo pretirano aktivacijo citoplazemskih RNK senzorjev, ki bi molekulo mRNK razgradili. (Za odkritje, da psevdouridin zmanjša imunogenost mRNK, je bila leta 2023 podeljena Nobelova nagrada za medicino.) Kljub tej modifikaciji se koncentracije mRNK še vedno večinoma določajo z merjenjem UV-absorpcije pri valovni dolžini 260 nm (A_{260}). N1-metilpsevdouridin absorbira približno

40 % manj UV-svetlobe pri 260 nm kot uracil, kar povzroči podcenjevanje koncentracij nukleozidno modificirane mRNK s 5–15 % napako, ki je odvisna od zaporedja mRNK. [1, 5]

Določanje koncentracije RNK se pogosto opira na meritve UV-absorpcije pri valovni dolžini 260 nm (A_{260}) in uporabo Beer-Lambertovega zakona. Natančnost teh meritev je odvisna od variabilne hipokromnosti RNK zaradi zaporedno odvisnega zvižanja. Ekstinkcijski koeficient zvite RNK pri 260 nm (ϵ_{260}) je nižji kot pri nezviti obliki. Zaradi teh variabilnosti se pogosto uporablja groba ocena ϵ_{260} za katerokoli enoverižno RNK, in sicer $\epsilon_{260} = 40 (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ na enoto absorbance, pri čemer je splošno sprejetih 10–20 % napake pri takšni oceni koncentracije RNK.

7.4 In vitro transkripcija

In vitro transkripcija je proces, pri katerem se RNK sintetizira v laboratorijskih pogojih, zunaj celice, v posebnem okolju, kjer so prisotni vsi potrebni encimi in snovi za ta proces. Omogoča visoko specifičnost, nadzor nad sekvenco RNK ter prilagodljivost količine in vrste RNK. Je nepogrešljivo orodje v sodobni biologiji in biotehnologiji, saj omogoča proizvodnjo sintetične RNK za raziskave in medicinske aplikacije. Ena najpomembnejših sodobnih aplikacij in vitro transkripcije je proizvodnja mRNK za cepiva in gensko terapijo. Primer tega so mRNK cepiva proti COVID-19, ki uporabljajo sintetizirano mRNK za izražanje virusnih antigenov v celicah gostitelja.

7.5 Vrste mRNK

V tej raziskovalni nalogi je bila prav molekula mRNK predmet mojega raziskovanja. Ker sem se v hipotezi spraševala, kako točen je ekstinkcijski koeficient za molekule mRNK, ki je podan v literaturi, sem tudi sama preko različnih metod primerjala ekstinkcijski koeficient za molekule mRNK, ki sem jih uporabila. Izbrala sem tri molekule mRNK različnih dolžin, ki predstavljajo razpon mRNK molekul, uporabljenih za terapijo.

7.5.1 mFix4

mFix4 standard je molekula mRNK, dolga 3969 nukleotidov (nt), ki vsebuje 95-nukleotidni poli(A) rep. Ta molekula se sintetizira skozi in vitro transkripcijo (IVT) z uporabo linearizirane pDNK (plazmidna DNK).

Standard se uporablja predvsem za testiranje ustreznosti PATfix sistema. Značilna je visoka stopnja čistosti, pri čemer je 95 ± 2 % mRNK poliadenilirane. [6]

7.5.2 eGFP

eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) je izboljšana različica proteina GFP, ki je bila optimizirana za večjo svetilnost in večjo stabilnost v različnih vrstah celic. eGFP mRNK je specifična mRNK, ki vsebuje informacije za sintezo tega proteina. Ko je eGFP mRNK vnesena v celice, omogoči proizvodnjo eGFP proteina, ki seva zeleno pod UV svetlobo. Zaradi teh lastnosti je eGFP široko uporabljen kot označevalec v bioloških raziskavah, vključno z raziskavami celične biologije, genetike in molekularne biologije. Ima dolžino 968 nukleotidov. [7]

7.5.3 saRNK

saRNK (ang. self-amplifying RNA (saRNA)) je posebna vrsta RNK, ki se lahko samopodvaja v celici, kar povzroči večji odziv telesa, kot bi ga povzročila enaka doza navadne mRNK. Nosi zapis za beljakovino, ki jo želimo proizvesti v celici (npr. antigen za cepivo ali terapevtski protein) in pa zapis za encim, ki omogoča, da se zapis za tarčni protein v celici samopodvaja.

Ena od prednosti saRNK je, da omogoča daljši in močnejši efekt tarčnega proteina ob manjši dozi cepiva, ki ima svoje negativne stranske učinke, torej dosežemo manj stranskih učinkov za močnejši želeni efekt. saRNK je dvakrat daljša od običajnih mRNK, ki se uporabljajo za terapije. Zaradi svoje velikosti (od 8000 pa tja do 14000 nukleotidov) predstavljajo precejšen izziv za čiščenje in analitiko. Tudi zato, ker z večanjem dolžine narašča verjetnost razgradnje molekule (avtohidrolize).

7.6 Metode

7.6.1 HPLC

Kromatografija

Kromatografija je laboratorijska tehnika za ločevanje, identifikacijo in analizo komponent v zmesi. Pri kromatografiji vzorec potuje skozi sistem, kjer se posamezne komponente ločujejo glede na interakcije s stacionarno (nepremična snov ali tekočina) in mobilno fazo (tekočina ali plin, ki nosi vzorec skozi sistem). Snovi, ki močneje

reagirajo s stacionarno fazo, se gibljejo počasneje, medtem ko se tiste, ki so bolj topne v mobilni fazi, premikajo hitreje.

Namen uporabe kromatografije, ki poleg ločevanja služi tudi kot metoda kvantitativne analize, je doseči zadovoljivo ločitev v ustreznem časovnem intervalu.

Kromatografijo delimo glede na agregatno stanje mobilne faze:

- Tekočinska kromatografija
- Plinska kromatografija
- Superkritična kromatografija

Kromatografije dalje glede na vrsto medija, s katerim molekule reagirajo, delimo še na:

- Tankoplastna kromatografija
- Papirna kromatografija
- Kolonska kromatografija

Nazadnje pa kromatografije delimo še na podlagi ločevanja molekul v vzorcu:

- Adsorpcijska kromatografija
- Porazdelitvena kromatografija
- Ionsko-izmenjevalna kromatografija
- Gelná kromatografija
- Afinitetna kromatografija

Visokotlačna kromatografija ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je kolonska kromatografija, pri kateri pod relativno visokim tlakom lahko ločujemo ali detektiramo snovi nizkih koncentracij. Če želimo, da bo pretok skozi takšno kolono dovolj velik (0,5 do 5 mL/min), moramo mobilno fazo potiskati skozi kolono z visokotlačno črpalko. Značilnost visokotlačne kromatografije je hitra in dobra ločljivost.

Pri visokotlačni kromatografiji raztopino substanc injiciramo na kromatografsko kolono, ki je napolnjena z različnimi polnili. Skozi kolono vodimo topilo (mobilna faza), ki ne reagira s polnilom (stacionarna faza). Topilo prenese zmes substanc skozi kolono. Pri HPLC lahko v koloni potekajo različni separacijski postopki: adsorpcija, porazdelitev in ločitev na osnovi velikosti molekul.

Danes je na razpolago mnogo stacionarnih faz za delo v tekočinski kromatografiji. Na razpolago imamo adsorpcijske stacionarne faze, kot je silikagel, reverzne faze vseh velikosti delcev z vezanimi različnimi skupinami, ionske izmenjevalce, posebne permeabilne stacionarne faze in kiralne stacionarne faze, ki se uporabljajo za ločitev optično aktivnih snovi. Monolitna kromatografija pa je posebna oblika tekočinske kromatografije, ki se od delčne kromatografije razlikuje v sestavi matriksa. V delčni kromatografiji je matriks sestavljen iz posameznih delcev, v katerih so pore in znotraj por so vezane skupine, ki privlačijo molekulo, ki potuje skozi kolono. Takšna kromatografija je optimalna za analiziranje manjših molekul, ko pa analiziramo večje molekule, kar je tudi mRNK, pa je takšna kolona neprimerna. Velike molekule ne morejo v pore in se zato ne vežejo pravilno na kolono oz. se sploh ne vežejo, lahko pa se zgodi, da se molekula celo zatakne v pori. Molekule se lahko ob nepravilni vezavi na matriks poškodujejo ali celo razpadejo. Zato se v analizi večjih molekul, kot so molekule mRNK in pDNK, uporablja monolitna kromatografija, ki ima matriks sestavljen iz kanalčkov, ki so vsi med seboj povezani in nobeden ni brez izhoda, kar občutno zmanjša možnost, da bi se molekula zataknila. Ti kanalčki imajo namenoma večji polmer, tako lahko velike molekule nemoteno prehajajo skozi kanalčke. Na stenah kanalčkov so vezane funkcionalne skupine, ki privlačijo molekulo.

Najenostavnejši HPLC sistem mora imeti naslednje komponente: rezervoar za mobilno fazo, črpalko, injektor, kromatografsko kolono, detektor in instrument za zapis signala.

Mobilne faze se nahajajo v steklenicah, na gornjem delu HPLC-ja, od koder se jih s pomočjo visokotlačne črpalke, ki mora zagotavljati enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono, potiska skozi sistem. S pomočjo injektorja v mobilno fazo injiciramo vzorec, ki ga mobilna faza prenese na stacionarno fazo – kolono.

Kolona je bistveni del HPLC sistema, saj se v njej dogajajo najpomembnejši procesi ločbe. Tukaj se vzorec selektivno veže na stacionarno fazo, ob ustrezni spremembi mobilne faze pa se sprostí s kolone, kar zaznamo z detektorjem, ki je vezan na kolono.

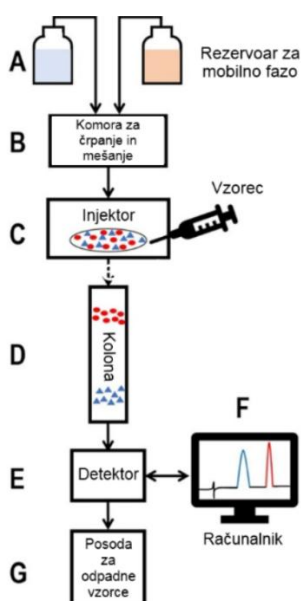
Glede na zgradbo matriksa v koloni poznamo monolitno kromatografijo in delčno kromatografijo.

Detektor je tisti del HPLC sistema, ki naredi substance, ločene na koloni, "vidne", kar zaznamo kot vrh na kromatogramu, ki se nam izrisuje na računalniku.

Mobilno fazo z izločenim vzorcem se lovi v posodo za odpadke, v primeru čiščenja vzorca pa se posamezne frakcije lovi v ustrezno embalažo.

Afinitetna kromatografija, ki sem jo tudi jaz uporabila pri meritvah na Oligo dT koloni, se uporablja za čiščenje encimov, hormonov, protiteles, nukleinskih kislin in specifičnih proteinov. Ligand, ki lahko tvori kompleks s specifičnim proteinom (npr. dekstran, poliakrilamid, celuloza itd.), se veže na polnilo kolone. Specifični protein, ki tvori kompleks z ligandom, se pritrdi na stacionarno fazo in ostane v koloni, medtem ko prosti proteini zapustijo kolono. Nato se vezani protein sprosti iz kolone s spremembo ionske jakosti, in sicer s prilagoditvijo pH ali pa s spremembo koncentracije raztopine soli.

Ionsko-izmenjevalna kromatografija je tehnika v kromatografiji, ki se uporablja za ločevanje ionov in polarnosti molekul v tekočinskih vzorcih, temelji pa na interakcijah med ioni in stacionarno fazo. Ta metoda omogoča selektivno ločevanje ionskih vrst, kot so kationi (pozitivni ioni) in anioni (negativni ioni), z uporabo izmenjevalne snovi, ki ima na svoji površini nabite skupine, sposobne vezati ione. Stacionarnana faza v ionsko-izmenjevalni kromatografiji je običajno polimer, obložen z nabitimi funkcionalnimi skupinami, ki se lahko vežejo bodisi na katione (pozitivne ione) bodisi na anione (negativne ione). Glede na naravo teh funkcionalnih skupin govorimo o kationski ali anionski izmenjevalni kromatografiji. [8]



Slika 3: Shematičen prikaz HPLC sistema (Vir: [9])

7.6.2 Spektroskopija

Spektroskopija je široko področje znanosti, ki preučuje, kako snov absorbira, oddaja ali razpršuje elektromagnetno sevanje. Spektrofotometrija je bolj specifična podvrsta spektroskopije, ki meri absorpcijo ali transmisijo svetlobe pri določenih valovnih dolžinah.

7.6.2.1 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je analitična metoda, ki meri absorpcijo svetlobe določene valovne dolžine pri prehodu skozi vzorec. Običajno jo merimo v tekočih vzorcih, z instrumentom, ki ga imenujemo spektrofotometer in merimo jo v vidnem, ultravijoličnem in infrardečem spektralnem območju. Glede na spekter svetlobe, ki ga seva vir svetlobe, razlikujemo: UV-spektrofotometer, Vis-spektrofotometer, UV-Vis-spektrofotometer, IR-spektrofotometer, NIR-spektrofotometer, Raman spektrofotometer.

UV-Vis spektrofotometrija: Uporablja ultravijolično in vidno svetlobo za analizo vzorcev. Pogosto se uporablja za kvantitativno določanje koncentracij različnih snovi. Ta vrsta spektrofotometrije je bila v uporabi tudi pri tej raziskovalni nalogi.

Vir svetlobe seva zvezni spekter, ta čas pa se meri prepustnost svetlobe vzorčka pri neki izbrani valovni dolžini ali spektru valovnih dolžin, ki najbolj ustrezajo maksimumom absorpcije. Med virom svetlobe in vzorcem je monokromator, ki izbere in prepušča izbrano valovno dolžino. V ta namen se uporabljajo prizme, uklonske mrežice ali pa filtri. Svetloba izbrane valovne dolžine gre skozi vzorec, kjer opravi določeno optično pot. Vzorec vlijemo v posodico z ravnimi stenami iz stekla ali umetne mase, ki ne absorbira svetlobe v danem območju. Posodico imenujemo kiveta. Pri prehodu skozi vzorec se del svetlobe absorbira, prepuščena svetloba pa pride do detektorja, ki izmeri njeno intenziteto. Začetne intenzitete ne poznamo, izmerimo jo tako, da merimo prepustnost slepega vzorca (oz. v mojem primeru sem izmerila prepustnost vzorca, ki je vseboval samo topilo, ne pa tudi topljenca), ki pri določeni valovni dolžini absorbira svetlobo. Razmerje med absorbirano svetlobo in koncentracijo snovi opisuje Beer-Lambertov zakon, ki pravi, da je absorbanca sorazmerna koncentraciji absorbirajoče snovi in dolžini poti svetlobe skozi vzorec.

Spektrofotometer je sestavljen iz naslednjih komponent: svetlobni vir, kiveta (ali druga vrsta medija, kamor damo vzorec) in detektor. [10]

Mikrovolumska spektroskopija je tehnika, ki omogoča kvantifikacijo in analizo biomolekul, kot so nukleinske kisline (DNK in RNK) in proteini, z uporabo zelo majhnih vzorcev (običajno 1–2 μL). Ta metoda temelji na merjenju absorpcije svetlobe pri določenih valovnih dolžinah, za nukleinske kisline je to najpogosteje pri 260 nm. Največja prednost mikrovolumske spektroskopije je majhna poraba vzorca.

7.6.3 Beer-Lambertov zakon

Beer-Lambertov zakon opisuje odvisnost štirih količin, ki jih uporabljamo pri merjenju s HPLC in UV-Vis spektrofotometrom:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

- **A** = absorbanca (brez enot),
- **ϵ** = ekstinkcijski koeficient ($(\mu\text{g}/\text{mL})^{-1} \text{cm}^{-1}$ na enoto absorbance), ki je konstanta in je specifična za vsako snov in za določeno valovno dolžino svetlobe. Pove nam, koliko svetlobe snov absorbira pri določeni koncentraciji in določeni valovni dolžini svetlobe,
- **l** = dolžina poti svetlobe skozi vzorec (v cm),
- **c** = koncentracija absorbirajoče snovi.

Absorbanco izračunamo s pomočjo meritev intenzitete vpadne svetlobe, to je svetlobe, preden je vstopila v raztopino opazovanega vzorca, in intenzitete prepuščene svetlobe oziroma svetlobe, ki je opravila pot skozi raztopino opazovanega vzorca, in ki v tem potovanju ni bila absorbirana. Intenziteto vpadne svetlobe označimo kot I_0 , intenziteto prepuščene svetlobe pa lahko označimo z I . Tako lahko absorbanco izračunamo še po enačbi:

$$A = \log_{10}(I_0/I)$$

Beer-Lambertov zakon omogoča merjenje absorbance določene raztopine in izračun koncentracije te raztopine, če je znano, da ta absorbira svetlobo določene valovne dolžine.

Vendar pa zakon velja predvsem za raztopine, kjer je koncentracija snovi majhna. Pri zelo visokih koncentracijah snovi ali pri zelo velikih absorbancah lahko pride do

odklonov od linearne proporcionalnosti, saj lahko snovi povzročijo nenatančne interakcije z svetlobnimi žarki, kar vodi do napak pri merjenju. [11]

7.7 Aparature

7.7.1 HPLC

Uporabljala sem PATfix sistem za tekočinsko kromatografijo v povezavi z dvema monolitnima kolonama afinitetno CIMac Oligo dT kolono in bimodalno šibko ionskoizmenjevalno CIMac PrimaS kolono.

Na obeh kolonah sem uporabila monolitno kromatografijo.

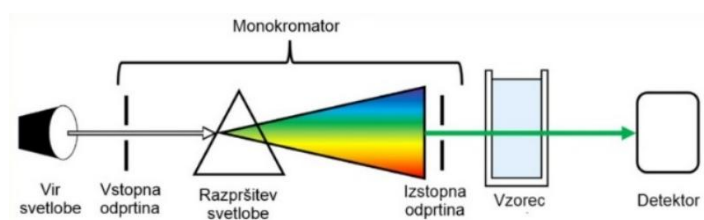
CIMac PrimaS je kolona, ki ima nosilec monolit, ki na aktivna mesta preko vodikovih vezi in ionskih privlakov specifično veže ustrezne delce. Primerna je za vezavo molekul RNK (v našem primeru mRNK), saj so molekule negativno nabite. Na kolono se molekula mRNK veže primarno preko fosfatnih skupin, ki imajo negativen naboj in kot del ogrodja niso skrite v strukturi. Ključna je sposobnost, da loči med DNK in RNK, ter da se eluira blizu 100 % celotne RNK, vezane na kolono. Elucijo dosežemo s povišanjem pH (oslabimo moč vezave šibkih anionskih izmenjevalnih skupin na koloni) in povišanjem koncentracije pirofosfatnih ionov. [12]

CIMac Oligo dT je kolona, ki ima monolit, na katerem so vezani oligonukleotidi, sestavljeni iz deoksitimidina (dT), ki so kovalentno vezani na trdno podporo. Afinitetna kromatografija omogoča, da se na kolono vežejo samo tiste molekule, ki imajo poli(A) rep. Molekule, ki imajo poli(A) rep, so samo mRNK molekule, zato se ta kolona največkrat uporablja za izoliranje molekul mRNK iz nečistega vzorca. [13]

mRNK vežemo v raztopini, ki vsebuje visoko koncentracijo soli, ki omogoči da se tvorijo vodikove vezi med dT na koloni in poli(A) repom mRNK molekule. mRNK eluiramo z znižanjem ionske moči in povišanjem pH.

7.7.2 Spektrofotometer

Vzorci sem merila v UV-Vis svetlobnem spektru, v 10 mm kivetih in kot kapljico. Vse meritve (na HPLC in s spektrofotometrom) sem opravila pri valovni dolžini 260 nm. Ta valovna dolžina najbolj ustreza maksimumu absorpcije za molekulo RNK.



Slika 4: Shematičen prikaz spektrofotometra (Vir: [14])

8 Eksperimentalni del

8.1 Priprava vzorcev

Preden sem lahko začela z izvedbo poskusov, sem morala najprej pripraviti vzorce. Vzorce sem pripravila na dva različna načina: del vzorcev je bil pripravljen z redčenjem, del vzorcev pa sem pripravila tako, da sem molekule mRNK v vzorcih razgradila.

8.1.1 Redčenje

Prvi del vzorčkov sem pripravila tako, da sem za vsako vrsto mRNK, ki sem jo vključila v svoj poskus (eGFP, saRNK, mFix4), imela podano koncentracijo. Koncentracija za mFix4 je bila 946 ng/μL, koncentracija za eGFP je bila 1250 ng/μL in koncentracija za saRNK je bila 797 ng/μL. Za vse tri vrste mRNK sem pripravila po 5 vzorcev z različnimi koncentracijami: 20 ng/μL, 25 ng/μL, 30 ng/μL, 35 ng/μL, 40 ng/μL. Te koncentracije sem uporabila, ker je pri 40 ng/μL absorbanca pri 260 nm za mRNK enaka 1 (standardni ekstinkcijski koeficient). Nato sem vzorčke linearno redčila, da lahko rezultate in metodo validiram na podlagi linearnosti.

Izračunala sem prostornino vzorca, ki sem ga dala v posamezno epruvetko. Epruvetko sem do 100 μL dopolnila s pufrom (1 mM amonijev citrat pri pH = 6,4).

Tako sem pripravila 15 vzorčkov:

eGFP 20 ng/μL, eGFP 25 ng/μL, eGFP 30 ng/μL, eGFP 35 ng/μL, eGFP 40 ng/μL

mFix4 20 ng/μL, mFix4 25 ng/μL, mFix4 30 ng/μL, mFix4 35 ng/μL, mFix4 40 ng/μL

saRNK 20 ng/μL, saRNK 25 ng/μL, saRNK 30 ng/μL, saRNK 35 ng/μL, saRNK 40 ng/μL

8.1.2 Razgradnja/hidroliza mRNK

Drugi del vzorčkov pa sem pripravila tako, da sem vzela 1 enoto vzorčka, kjer je bila posamezna molekula mRNK s koncentracijo 1000 ng/μL, nato pa sem dodala 4 enote 1 M NaOH. Vzorčke sem 1 uro inkubirala pri 37 °C. Molekula mRNK naj bi se pod takimi pogoji in v tem časovnem obdobju razgradila na nukleotide.

Tako sem pripravila 3 vzorčke:

eGFP 40ng/μL (hidrolizirana)

mFix4 40 ng/ μ L (hidrolizirana)

saRNK 40 ng/ μ L (hidrolizirana)

8.2 Merjenje

8.2.1 Merjenje na spektrofotometru

Najprej sem na vseh vzorcih, ki sem jih pripravila s pomočjo redčenja, opravila meritve v 10 mm kiveti. Preden sem opravila meritve kateregakoli vzorčka, sem v kiveto odmerila 100 μ L pufru (amonijev citrat), ki je imel vlogo praznega vzorca (ang. blank), in ki sem ga sistemsko odštela za vse nadaljnje meritve vzorcev. Tako sem po končanem merjenju dobila rezultate samo za vzorec – molekulo mRNK, ki je bila raztopljena v pufru (amonijev citrat). V kiveto sem odmerila 100 μ L vsakega od 15 vzorčkov. Meritev je potekla, ko je svetlobni vir spektrofotometra presvetlil vzorec. Po merjenju vsakega posameznega vzorca sem raztopino v kiveti s pipeto prelila nazaj v epruvetko in vzorec shranila za nadaljnje meritve, kiveto pa očistila z destilirano vodo in alkoholom.

Na vseh vzorcih, ki sem jih pripravila s pomočjo redčenja, sem nato opravila meritve še z mikrovolumsko spektrometrijo. Meritve so opravljene zelo podobno kot v kiveti. Razlika je le v volumnu vzorca, ki ga naprava preseva s svetlobo. Na spektrofotometru je volumen vzorca le 2 μ L, medtem ko je v kiveti volumen 100 μ L. Na mesto, kjer je svetloba presevala, sem s pipeto kapnila 2 μ L posameznega vzorčka. Rezultati so preračunani na 10 mm poti, ki jo opravi svetloba, tako kot v kiveti. Po vsaki meritvi sem mesto, kamor sem vzorec nanašala, očistila. Na vsakem od 15 vzorčkov sem opravila 3 meritve. Tako sem povečala natančnost meritev, saj sem dokazala, da rezultat ni samo naključen.

Za meritve absorbance sem uporabila dva spektrofotometra: IMPLEN NP80 za merjenje vzorčka s kiveto in mirovolumsko spektrometrijo ter Thermo Fisher Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spektrofotometer prav tako za mikrovolumsko merjenje absorbance.

Meritve za razgrajene molekule mRNK sem prav tako opravila na IMPLEN NP80 spektrofotometru s kiveto.

Rezultate sem nato iz vseh instrumentov izvozila in jih obdelala.

8.2.2 Merjenje na HPLC

Na HPLC sistemu sem opravila dve različni meritvi. Prva meritev je bila opravljena s PrimaS kolono, druga pa z Oligo dT kolono. V ta namen sem preostanek vzorcev (80 μL), pripravljenih z redčenjem, razdelila na pol (40 μL) in jih redčila do volumna, ki sem ga potrebovala za opravljanje meritev. Za meritve, opravljene na Oligo dT, sem vseh 15 vzorcev redčila na 40 % začetne koncentracije posameznega vzorčka (npr.: eGFP 40 ng/ μL sem tako redčila na eGFP 16 ng/ μL). Za meritve, opravljene na PrimaS, pa sem vzorčke redčila na 25 % začetne koncentracije posameznega vzorčka (npr.: eGFP 40 ng/ μL sem tako redčila na eGFP 10 ng/ μL). Prav tako pa sem z Oligo dT kolono opravila meritve na vzorcih, ki so vsebovali razgrajene molekule mRNK. Ker se na kolono Oligo dT vežejo samo poli(A) repi, ki so iz vsaj desetih A nukleotidov, bi morale meritve pokazati, da se na kolono ni vezalo nič, če se je le molekula razgradila do konca.

Vzorčke sem s pipeto prenesla iz epruvetk, v katerih sem jih hranila, in jih premestila v vialo. To so majhne stekleničke, ki imajo volumen 1 mL ali 2 mL, in imajo pokrovček, ki ga lahko prebode igla avtomatskega vzorčevalnika ob injiciranju.

Meritve na HPLC sistemu sem upravljala računalniško. Najprej sem v sistemu določila metodo. V metodi je zapisano menjavanje mobilnih faz v odvisnosti od časa.

Nato sem v sistem zapisala sekvenco, tj. zaporedje, po katerem sem želela, da sistem injicira vzorčke in opravi meritve na njih. Za vsak korak oz. za vsako injiciranje sem določila časovni interval 10 min.

V sekvenci sem zapisala tudi, na katerih mestih vzorčevalnika se nahaja posamezen vzorec. Tako je sistem avtomatsko vedel, kateri vzorec injicirati. Vzorčevalnik z vzorčki je bil toplotno izoliran z izolacijskim pokrovom. Temperaturo hlajenja vzorcev sem nastavila na 8 °C in jo je HPLC vzdrževal, da se vzorčki niso pokvarili.

Preden sem začela s sekvenco, sem v vsako steklenico z mobilno fazo (A, B, C, D) vstavila pripadajočo cevko. Medtem ko je v sistemu potekal pretok 5 mL/min, sem opazovala cevko, da v njej ni ostalo nobenih zračnih mehurčkov, ki bi lahko motili merjenje in posledično rezultate. To sem ponovila za vsako mobilno fazo (mobilna faza A je bil pufer s soljo (mešanica HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina), natrijevega fosfatnega pufra pri pH = 7,4 in 0,5 M NaCl), mobilna faza B je bil

pufer brez soli (mešanica HEPES in natrijevega fosfata pri pH = 7,4), mobilna faza C je bil 10 mM CAPS (3-(cikloheksilamino)-1-propansulfonska kislina) pri pH = 11 in mobilna faza D je bil 0,5 M NaOH.

V začetku sem sistem 3-krat sprala s praznim vzorcem (ang. blank). Tako so se odstranile vse nečistoče, ki bi lahko ostale v sistemu še od prejšnjih meritev in bi lahko motile merjenje. To sem spremljala na monitorju, na katerem so se na grafu izrisovali vrhovi. Z vsako ponovitvijo praznega vzorca (ang. blank) so se vrhovi nižali. To je bil pokazatelj, da se je HPLC sistem čistil – vedno manj nečistoč, ki bi dajale signal, je bilo v sistemu.

Nato sem kot poskusno meritev izmerila vzorec za preizkus ustreznosti sistema (ang. System suitability test (SST)) (to je meritveni standard), za katerega sem vedela, kakšni vrhovi se morajo izrisati na grafu. Ker so bili vrhovi, izrisani na grafu, pravilni, sem lahko začela z dejanskimi meritvami.

Pred in po vsaki različni mRNK, ki sem jo merila (npr.: eGFP z vsemi koncentracijami), se je sistem prečistil s praznim vzorcem (blank). Sistem je bil čist in HPLC je lahko injiciral vzorce z novo mRNK.

Ko so bili vsi vzorci izmerjeni, je sistem še enkrat izmeril SST. Na grafu so se izrisali enaki vrhovi, kot na začetku. To je bilo potrdilo, da je HPLC ves čas deloval pravilno.

Rezultati, ki so bili izmerjeni na HPLC sistemu, so bili malo drugače podani, kot so bili pri merjenju na spektrofotometrih. Rezultati merjenj na spektrofotometrih so bile vrednosti, ki sem jih lahko že takoj vnesla v grafe in iz njih dobila neke zaključke, medtem ko sem na sistemu HPLC kot rezultate dobila samo na grafu izrisane vrhove. Te vrhove sem morala integrirati, da sem nato lahko površino pod vrhom, ki je določal mRNK, primerjala še z drugimi količinami.

8.2.3 Računanje s pomočjo mRNACalc

Vzorčke, ki sem jih pripravila s pomočjo hidrolize mRNK, sem merila s HPLC in spektrofotometrom. Na HPLC sem opravila meritev z Oligo dT kolono, da bi dokazala, da se je mRNK zares razgradila. V primeru, da so se posamezne molekule mRNK razgradile, se na kolono ne bi smelo nič vezati, torej na mestu, kjer smo dobili vrh pri vseh drugih meritvah vzorčkov, narejenih z redčenjem, vrha ne bi smelo biti oz. bi vrh

moral biti občutno nižji od drugih. Nizek vrh bi pomenil, da se je posamezna molekula mRNK delno razgradila.

Iz meritev na spektrofotometru pa sem dobila absorbanco za vsak vzorec mRNK (eGFP, mFix4, saRNK), ki sem jo nato vnesla v mRNACalc, ki je s pomočjo določenih logaritmov in vnaprej določenih ekstinkcijskih koeficientov posameznih nukleotidov izračunal koncentracijo.

8.2.4 Določanje koncentracije na 3 načine

Odločila sem se še za primerjavo koncentracij mRNK molekul. Vsak vzorec mRNK, uporabljen v meritvah, je imel že vnaprej določeno koncentracijo. Ta koncentracija je bila določena s kvantifikacijo na UV-Vis spektrofotometru. Koncentracije so bile:

eGFP	1250 ng/ μ L
mFix4	946 ng/ μ L
saRNK	797 ng/ μ L

Tabela 1: Začetne koncentracije vzorcev mRNK

Ko sem opravila meritve redčenih vzorcev na spektrofotometru, sem poleg absorbance merila tudi koncentracijo. Povprečje izmerjenih koncentracij (opravila sem tri meritve, dva z mikrovolumetrično UV-Vis spektrofotometrijo in eno v kiveti) za vsak vzorec sem množila z redčitvenim faktorjem, ki sem ga uporabila pri redčenju. Tako sem spet prišla nazaj do koncentracije za posamezno mRNK.

Tretji podatek o koncentraciji za molekule mRNK pa sem dobila tako, da sem v mRNACalc vnesla na spektrofotometru izmerjene absorbance vzorčkov, ki so vsebovali razgrajeno mRNK.

S pomočjo primerjave treh koncentracij sem lahko v nadaljevanju določila, kako točna je določitev koncentracije s spektrofotometrom.

9 Rezultati

9.1 Primerjava koeficientov

Da bi lahko ovrednotila prvo zastavljeno hipotezo, ki se nanaša na točnost ekstinkcijskega koeficienta, sem vse pridobljene rezultate obdelala tako, da sem naredila grafe absorbance v odvisnosti od koncentracije. Takšne grafe sem lahko naredila le iz podatkov na spektrofotometru, saj podatki iz HPLC meritev niso vsebovali direktnega podatka o absorbanci. Podatke iz HPLC sem obdelala tako, da sem naredila grafe površine pod vrhom v odvisnosti od koncentracije.

Te količine sem si izbrala zaradi povezave z enačbo, ki jo določa Beer-Lambertov zakon:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

9.1.1 Spektrofotometer

Opazovala sem, kako se ekstinkcijski koeficient spreminja glede na 3 vrste mRNK, ki sem jih uporabila pri meritvah, in tudi med samimi metodami (na HPLC in na spektrofotometru). Količina l (dolžina poti, ki jo je prepotovala svetloba, ki je sevala skozi vzorec) je bila na vseh aparaturah konstantna (10 mm).

Napravila sem grafe absorbance v odvisnosti od koncentracije. V grafe sem vnesla linearno premico, ki se je najbolje prilegala vsem podatkom in izračunala enačbo premice ($y = kx+n$), pri kateri sem opazovala le koeficient (k). Razmerje med koncentracijo vzorca in njegovo absorbanco je po Beer-Lambertovem zakonu odvisno od ekstinkcijskega koeficienta in dolžine poti žarka. Ker je bila dolžina poti konstantna, je torej razmerje med absorbanco in koncentracijo odvisno samo od ekstinkcijskega koeficienta. Razmerje med koncentracijo in absorbanco v enačbi premice ponazarja smerni koeficient premice (k). Če bi torej imele vse mRNK molekule enak ekstinkcijski koeficient, bi imele tudi enak koeficient premice (k).

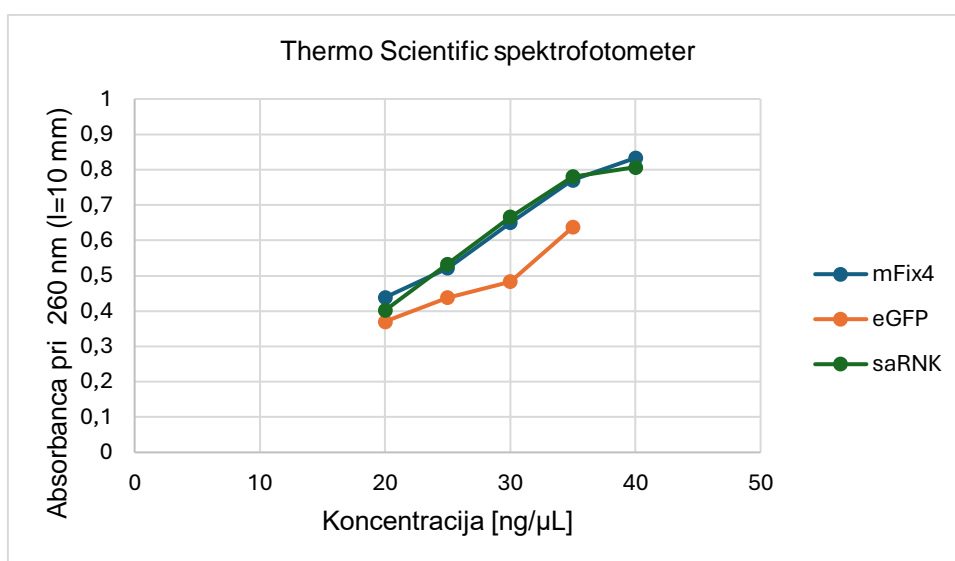
Na grafih za eGFP so podatki samo štirih koncentracij. Vzoreček, ki bi moral imeti najvišjo koncentracijo, zaradi nepozornosti sploh ni vseboval molekule mRNK. To so pokazale čisto vse meritve, saj je bila izmerjena absorbanca na spektrofotometrih blizu 0, na HPLC sistemu pa je bil vrh na grafu zelo majhen.

Določevanje koncentracije mRNK

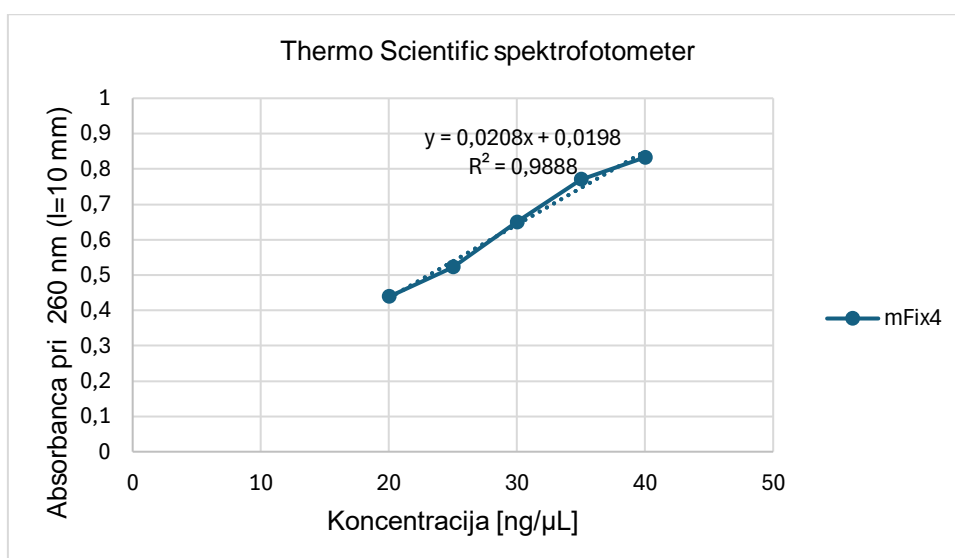
		Absorbanca	Vrsta kolone		Površina pod vrhom [mAU.s]
IMPLEN NP80 spektrofotometer (kiveta)	eGFP 40 ng/ μ L	0,02	PrimaS	eGFP 10 ng/ μ L	1,3
IMPLEN NP80 spektrofotometer	eGFP 40 ng/ μ L	1,0	Oligo dT	eGFP 16 ng/ μ L	3,2
Thermo Fisher-NanoDrop	eGFP 40 ng/ μ L	0,9			

Tabela 2: Izmerjene absorbance in površina pod vrhom za eGFP, ki ni vsebovala vzorca

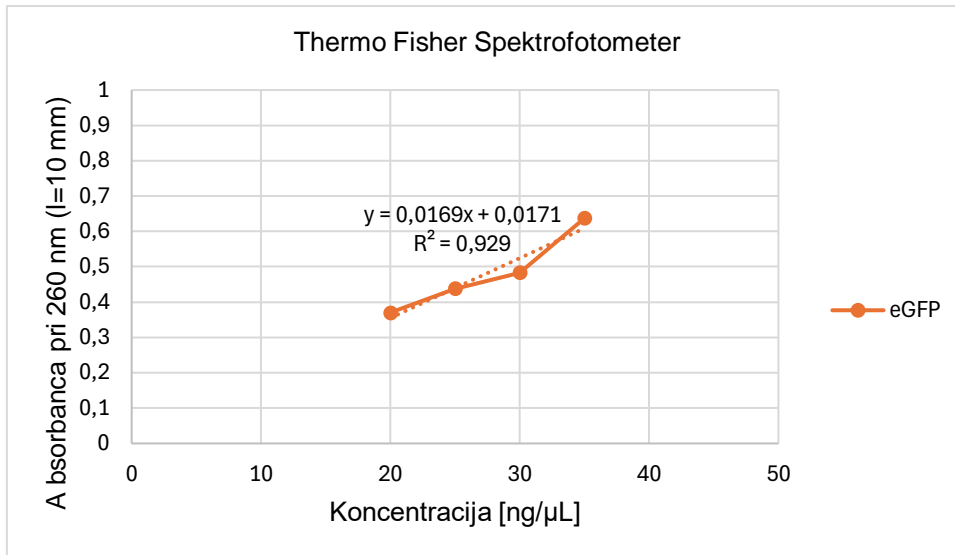
Grafi meritev na Thermo Fisher Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis spektrofotometru:



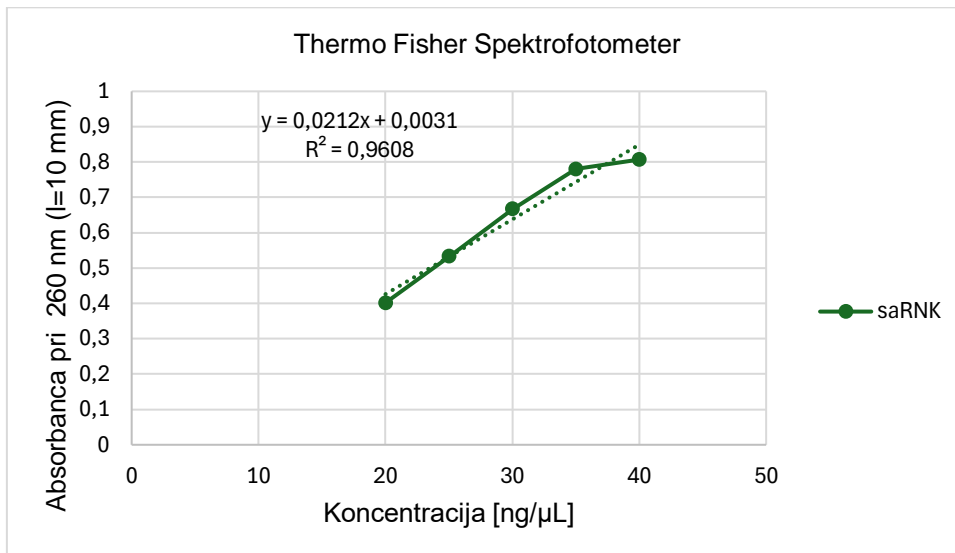
Graf 1: Meritve vseh treh vrst molekul na Thermo Fisher spektrofotometru



Graf 2: Meritev mFix4 na Thermo Fisher spektrofotometru

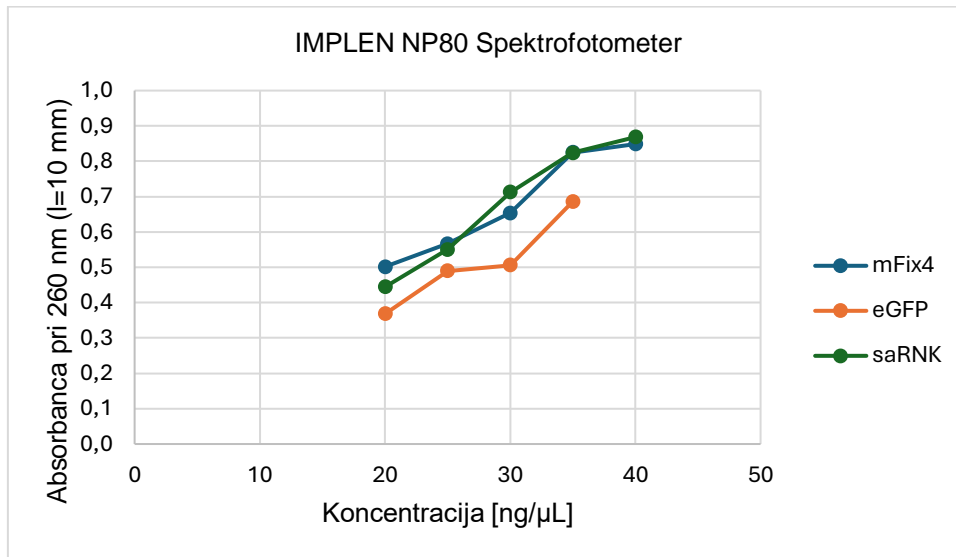


Graf 3: Meritev eGFP na Thermo Fisher spektrofotometru

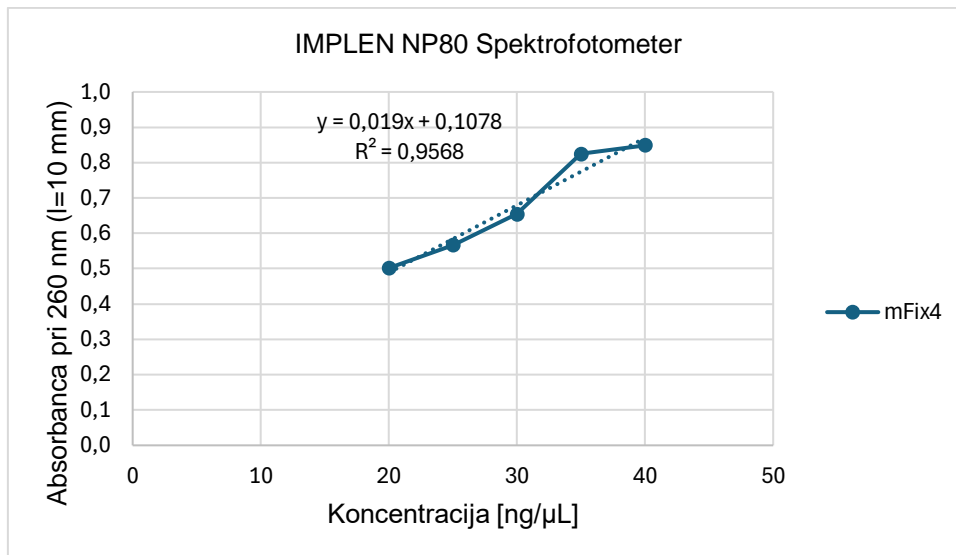


Graf 4: Meritev saRNK na Thermo Fisher spektrofotometru

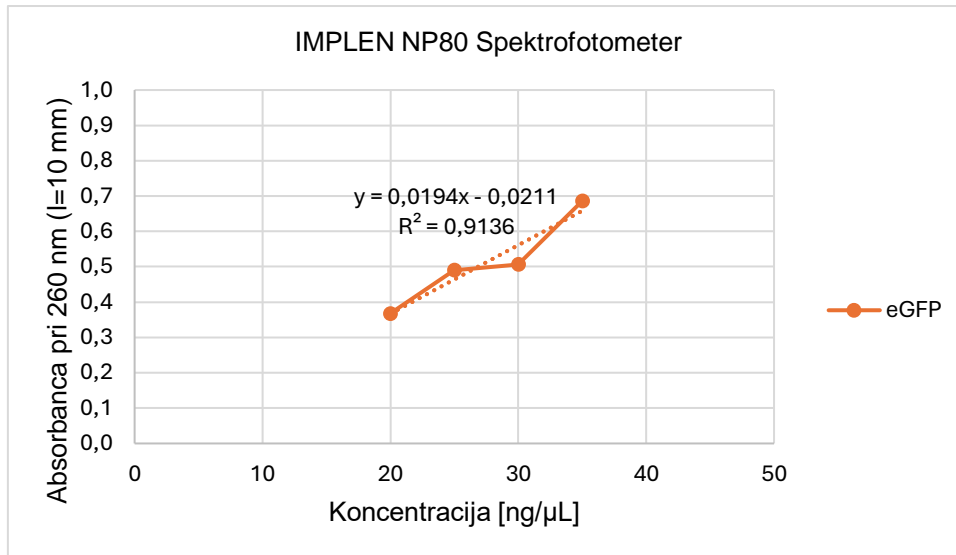
Grafi meritev na IMPLEN NP80 spektrofotometer (mikrovolumska spektrometrija):



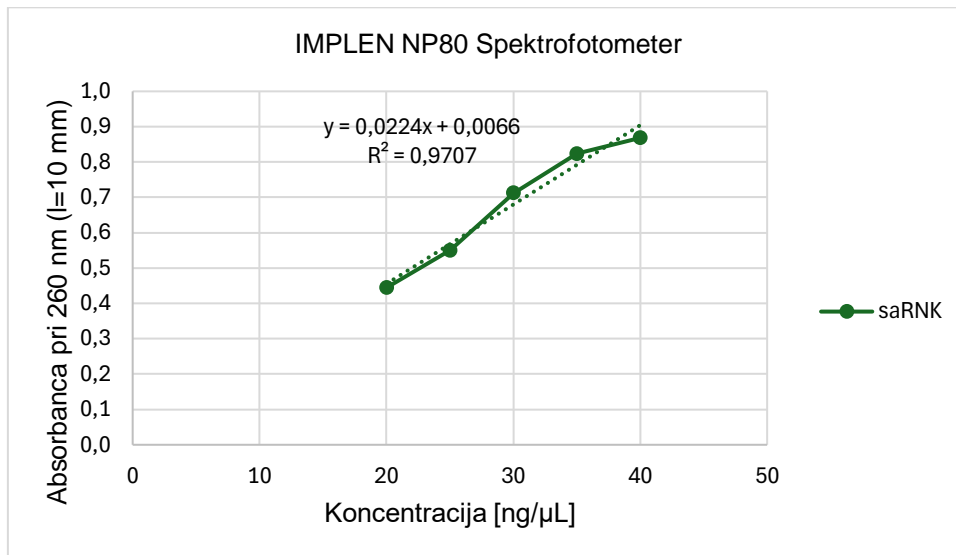
Graf 5: Meritve vseh treh vrst molekul na IMPLEN NP80 spektrofotometru



Graf 6: Meritev mFix4 na IMPLEN NP80 spektrofotometru

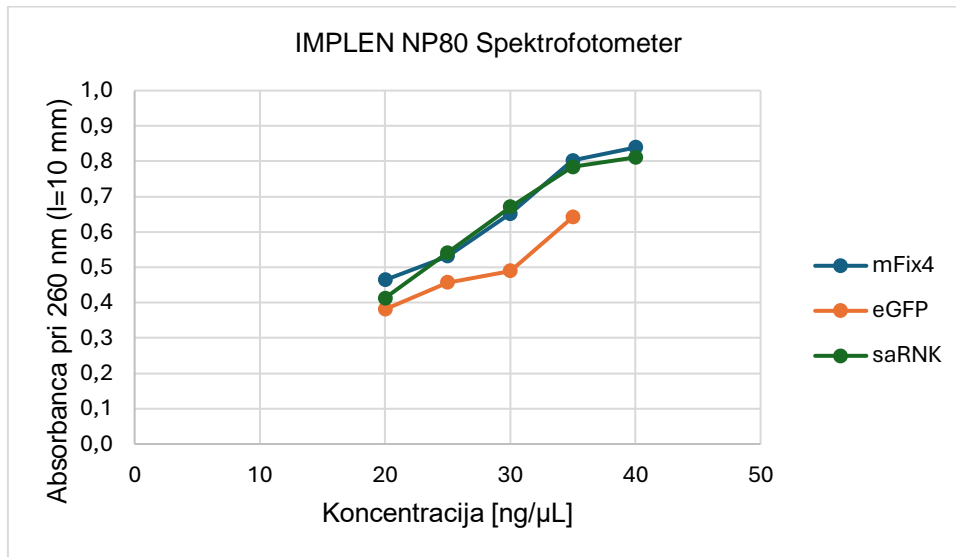


Graf 7: Meritev eGFP na IMPLEN NP80 spektrofotometru

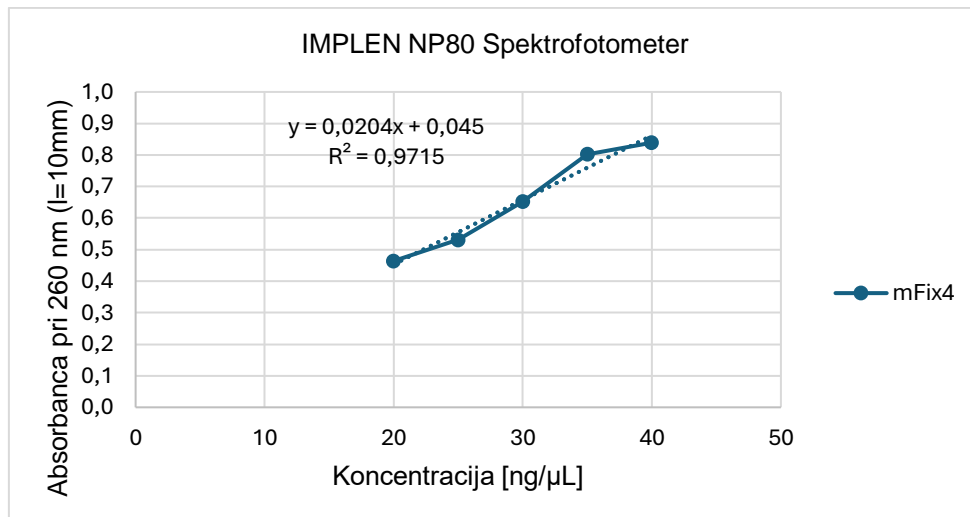


Graf 8: Meritev saRNK na IMPLEN NP80 spektrofotometru

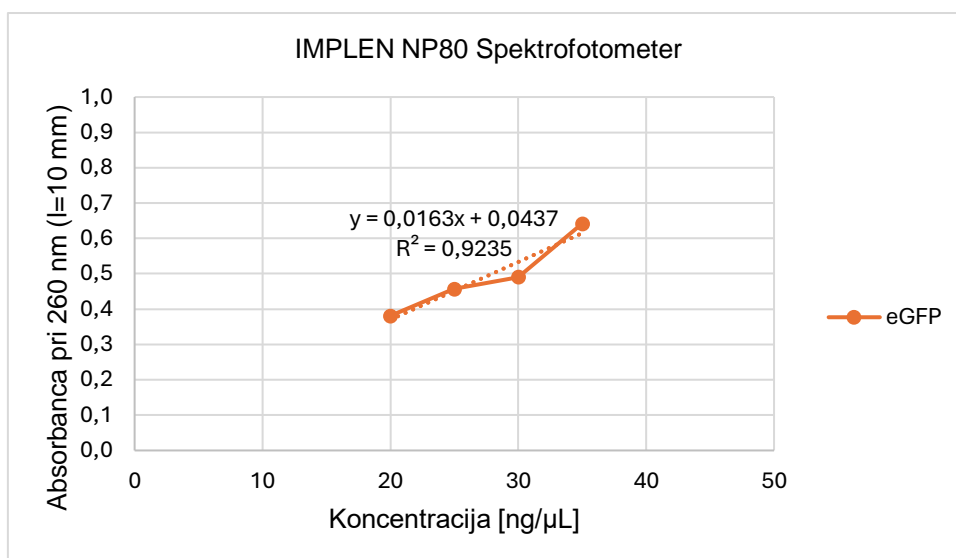
Grafi meritev na IMPLEN NP80 spektrofotometru v kivetih:



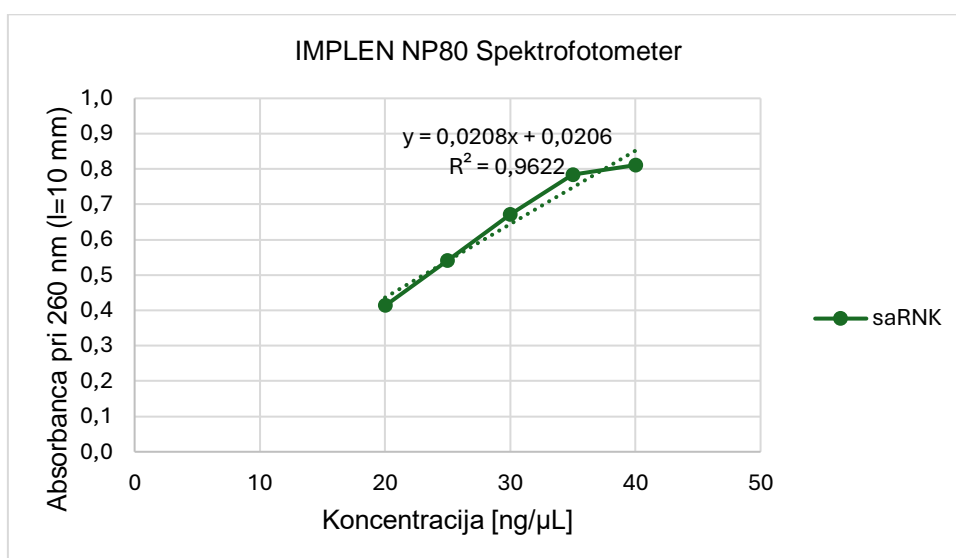
Graf 9: Meritve vseh treh vrst molekul na IMPLEN NP80 spektrofotometru (v kivetih)



Graf 10: Meritev mFix4 na IMPLEN NP80 spektrofotometru (v kivetih)



Graf 11: Meritev eGFP na IMPLEN NP80 spektrofotometru (v kivetih)



Graf 12: Meritev saRNK na IMPLEN NP80 spektrofotometru (v kivetih)

Med sabo sem primerjala koeficiente premic in ugotovila, da se njihove vrednosti razlikujejo. Razlike v vrednostih niso velike, vendar pa lahko tudi majhne vrednosti, prenesene na večje količine, drastično vplivajo na rezultat. Iz grafov pa tudi razberemo, da koeficient premice pri eGFP odstopa od mFix4 in saRNK, ki pa se skoraj popolnoma prilegata.

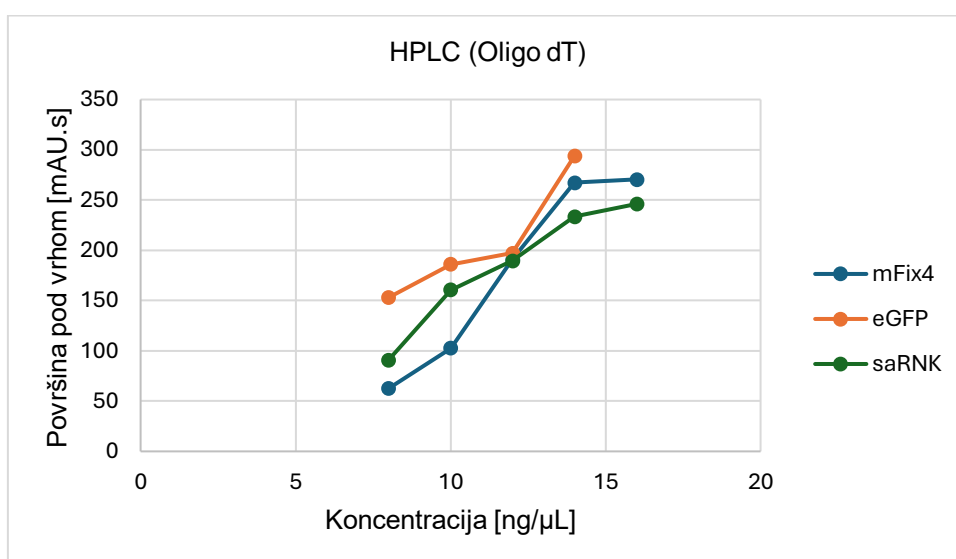
	vrsta RNK	koeficient		Vrsta RNK	koeficient		Vrsta RNK	koeficient
Thermo Fisher-NanoDrop	mFix4	0,0208	IMPLEN NP80 spektrofotometer	mFix4	0,0190	IMPLEN NP80 spektrofotometer (kiveta)	mFix4	0,0204
	eGFP	0,0169		eGFP	0,0194		eGFP	0,0163
	saRNK	0,0212		saRNK	0,0224		saRNK	0,0208

Tabela 3: Primerjava koeficientov premic na grafih

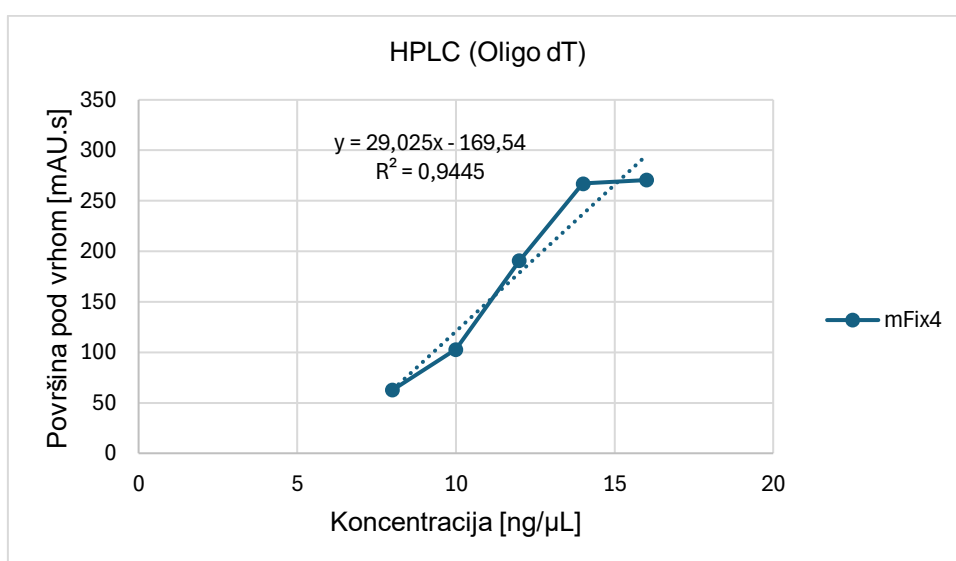
9.1.2 HPLC

Podatke, pridobljene z merjenjem s HPLC, sem vnesla v grafe zelo podobno kot podatke, pridobljene s spektrofotometra. Tako kot se absorbanca veča s koncentracijo, tako se tudi površina pod vrhom na grafu, ki ga izriše HPLC, veča s koncentracijo. Zato sem tudi tokrat naredila grafe površine pod vrhom v odvisnosti od koncentracije. Tudi v te grafe sem vnesla linearno premico, ki se je najboljše prilegala vsem podatkom. Nato pa sem tej linearni premici prav tako dodala še enačbo premice ($y = kx+n$), iz katere sem opazovala le koeficient (k).

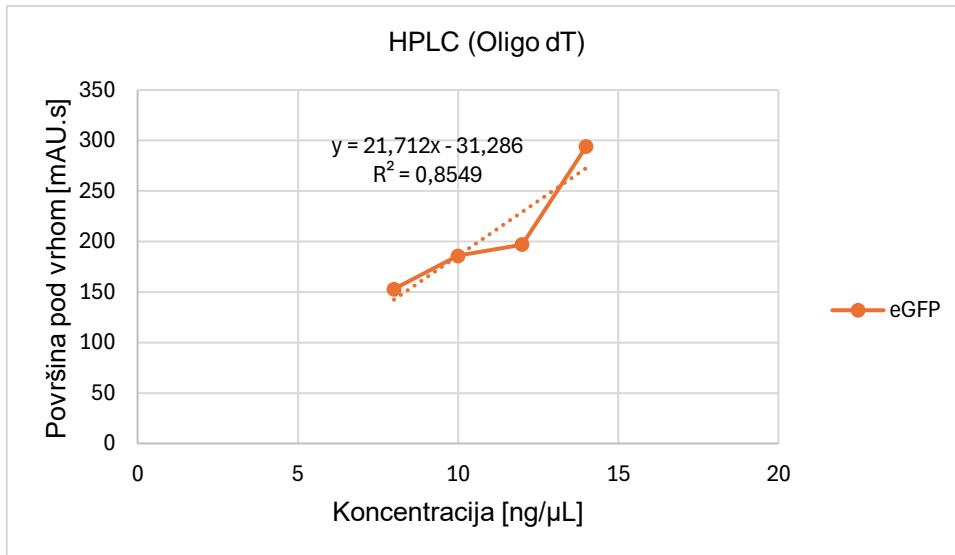
Meritve opravljene na HPLC s kolono Oligo dT:



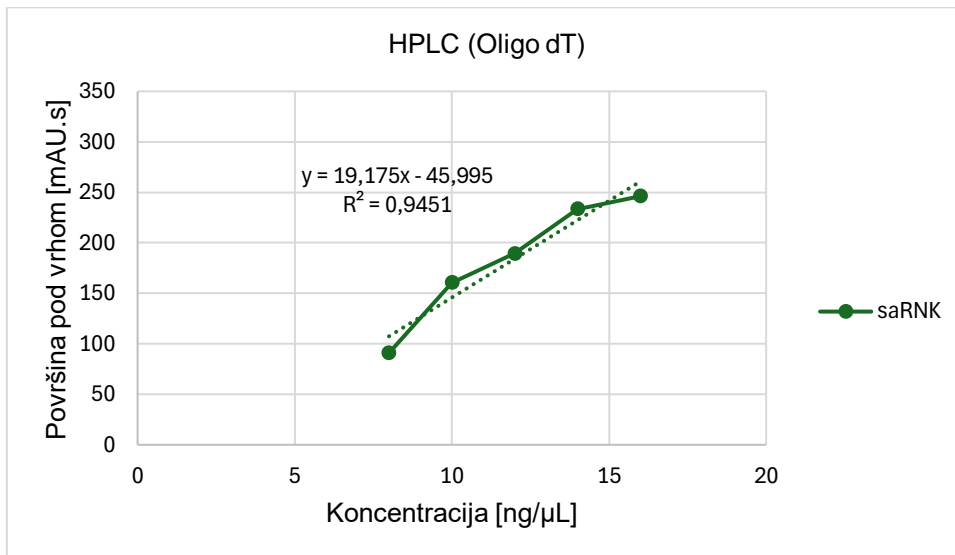
Graf 13: Meritve vseh treh vrst molekul na HPLC z Oligo dT kolono



Graf 14: Meritev mFix4 na HPLC z Oligo dT kolono

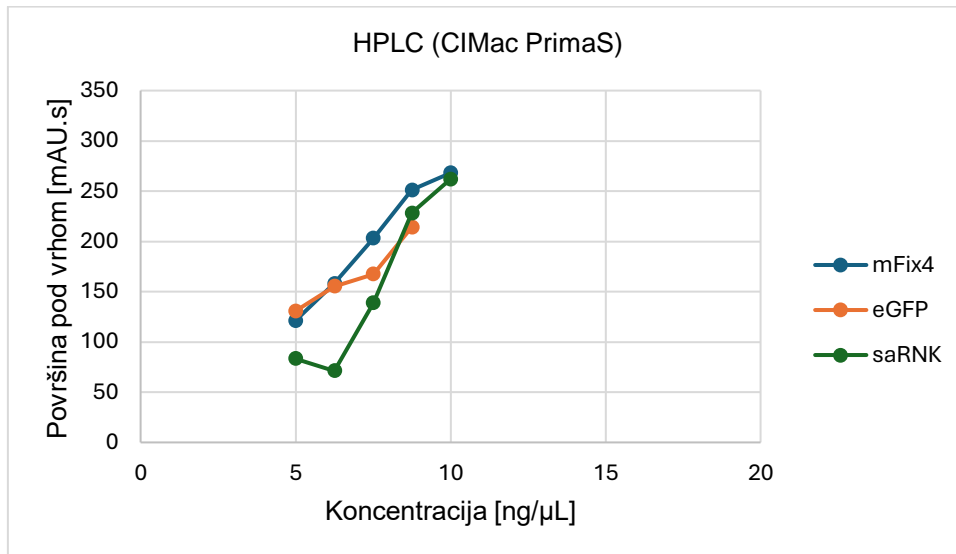


Graf 15: Meritev eGFP na HPLC z Oligo dT kolono

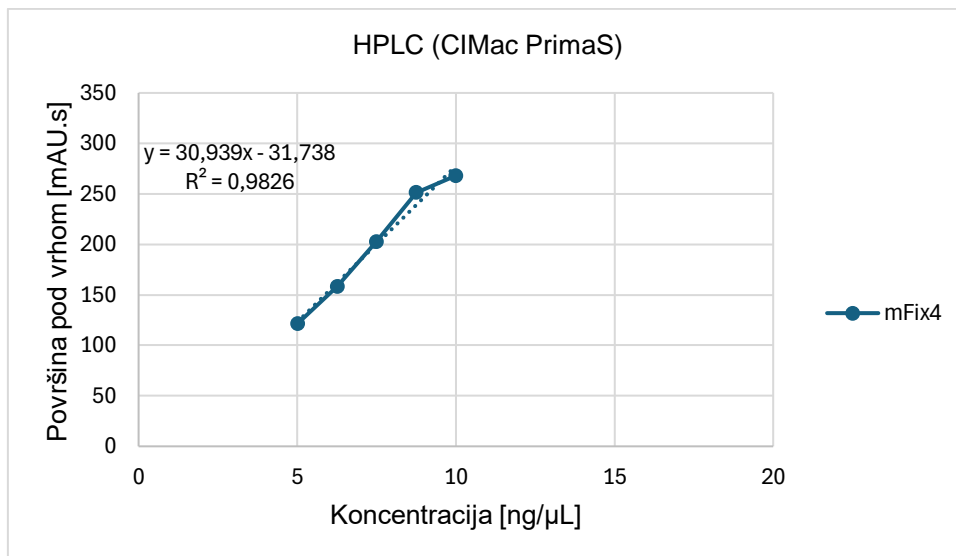


Graf 16: Meritev saRNK na HPLC z Oligo dT kolono

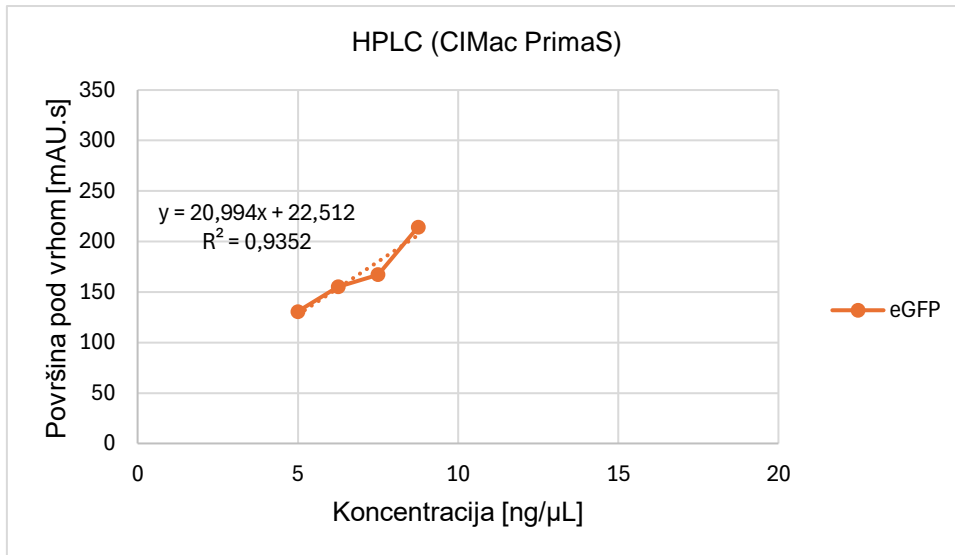
Meritve opravljene na HPLC s kolono CIMac PrimaS:



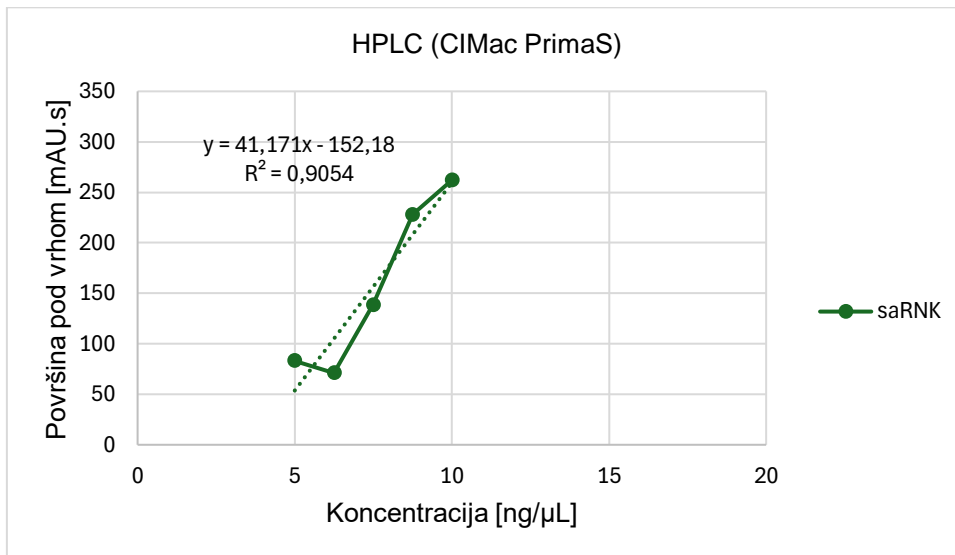
Graf 17: Meritve vseh treh vrst molekul na HPLC z CIMac PrimaS kolono



Graf 18: Meritev mFix4 na HPLC s CIMac PrimaS kolono



Graf 19: Meritev eGFP na HPLC s CIMac PrimaS kolono



Graf 20: Meritev saRNK na HPLC s CIMac PrimaS kolono

Med sabo sem primerjala koeficiente premic in ugotovila, da se njihove vrednosti močno razlikujejo:

Kolona	RNK	koeficient
Oligo dT	mFix4	29,0
	eGFP	21,7
	saRNK	19,2
C1Mac PrimaS	mFix4	30,9
	eGFP	21,0
	saRNK	41,2

Tabela 4: Primerjava koeficientov premic na grafih

9.2 Primerjava koncentracij

Ker so se koncentracije, izmerjene na spektrofotometrih, razlikovale od pričakovanih koncentracij redčenja, se je pojavilo vprašanje, ali je merjenje na spektrofotometru točna metoda, saj so bile koncentracije eGFP 1250 ng/μL, mFix4 946 ng/μL, saRNK 797 ng/μL določene prav s kvantifikacijo na spektrofotometru.

Določena koncentracija redčenja	Thermo Fisher-NanoDrop	IMPLEN NP80	IMPLEN NP80 (kiveta)
mFix4 20 ng/μL	17,5	19,8	18,6
mFix4 25 ng/μL	20,9	22,5	21,2
mFix4 30 ng/μL	26,0	26,0	26,1
mFix4 35 ng/μL	30,8	32,8	32,1
mFix4 40 ng/μL	33,3	34,1	33,6
eGFP 20 ng/μL	14,8	14,6	15,2
eGFP 25 ng/μL	17,5	19,4	18,3
eGFP 30 ng/μL	19,3	20,1	19,6
eGFP 35 ng/μL	25,5	27,1	25,7
eGFP 40 ng/μL	0,9	1,0	0,7
saRNK 20 ng/μL	16,1	17,5	16,5
saRNK 25 ng/μL	21,3	21,7	21,6
saRNK 30 ng/μL	26,7	28,2	26,8
saRNK 35 ng/μL	31,2	32,5	31,4
saRNK 40 ng/μL	32,3	34,3	32,4

Tabela 5: Izmerjene koncentracije v primerjavi s koncentracijami, določenimi pri redčenju

Po primerjavi koncentracij za vsako molekulo mRNK, ki sem jo potem redčila na koncentracije 20 ng/μL, 25 ng/μL, 30 ng/μL, 35 ng/μL, 40 ng/μL, in koncentracij, ki jih je izmeril spektrofotometer, sem izračunala povprečje relativnih napak za vsak vzoreček in dobila rezultate:

	Povprečje relativnih napak
Thermo Fisher - NanoDrop	19 %
IMPLEN NP80	15 %
IMPLEN NP80 (kiveta)	17 %

Tabela 6: Odstopanje koncentracije, predpostavljene pri redčenju, od koncentracije, zmerjene na spektrofotometrih

Zato sem med sabo primerjala 3 različne koncentracije. V poglavju Določanje koncentracije na 3 načine sem opisala postopek za izračun treh različnih koncentracij:

eGFP	1250 ng/ μ L
mFix4	946 ng/ μ L
saRNK	797 ng/ μ L

Tabela 7: Koncentracije, določene z UV-Vis spektrofotometrom (začetne koncentracije vzorcev pred redčenjem)

eGFP	900 ng/ μ L
mFix4	835 ng/ μ L
saRNK	691 ng/ μ L

Tabela 8: Koncentracije, določene z meritvijo koncentracij redčenih vzorcev na spektrometru in nato računanje z redčitvenimi koeficienti

eGFP	845 ng/ μ L
mFix4	736 ng/ μ L
saRNK	493 ng/ μ L

Tabela 9: Koncentracije, določene z mRNACalc

Iz teh izračunov lahko ugotovimo, da se koncentracije med sabo ne ujemajo (zagotovo niso vse pravilne). Na to je lahko vplivalo veliko dejavnikov, eden izmed teh bi lahko bila točnost UV-Vis spektrofotometra. Spektrofotometer, na katerem je bila izmerjena začetna koncentracija molekul mRNK, uporablja univerzalni ekstinkcijski koeficient $\epsilon_{260} = 40 (\mu\text{g/mL})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ na enoto absorbance za molekule mRNK. Verjetno je ta dejavnik eden glavnih povzročiteljev razlik v koncentracijah.

9.3 Razgradnja mRNK s hidrolizo

S pomočjo Oligo dT kolone sem merila absorbanco mRNK za vzorčke, kjer so bile prisotne nerazgrajene molekule, v vzorčkih, kjer pa sem mRNK razgradila, pa sem lahko tudi to potrdila, saj so meritve pokazale, da se na kolono ni nič vezalo. Ob tistem času, ko se je pri nerazgrajenih molekulah na grafu narisal vrh, se pri razgrajenih ni izrisal noben vrh. Iz meritev, ki sem jih opravila na spektrofotometru s kiveto, sem

dobila absorbanco, ki sem jo nato vnesla v mRNACalc in nato računala koncentracijo za primerjanje.

10 Razprava in zaključek

10.1 Ovrednotenje hipotez

Hipotezo 1 potrdim. Iz grafov, izrisanih iz meritev tako na HPLC kot na UV-Vis spektrofotometru, v poglavju Rezultati, lahko razberem, da koeficienti premic med sabo niso bili enaki. Najboljši približek sta naredila koeficienta premic na mFix4 in saRNK iz meritev na UV-Vis spektrofotometrih. Še vseeno nista popolnoma skladna, zato lahko trdim, da je ekstinkcijski koeficient, ki je podan literaturi, le neka srednja vrednost ekstinkcijskih koeficientov za vse mRNK molekule. Ko pa se obravnava posamezno vrsto molekul mRNK, pa ekstinkcijski koeficient odstopa. Kakšno odstopanje od pravih koncentracij lahko povzroči uporaba univerzalnega ekstinkcijskega koeficienta, še ne morem oceniti, vendar pa je to odstopanje z višanjem koncentracije vedno večje.

Velik približek koeficientov premic mFix4 in saRNK je vzbudil moje zanimanje. Zato sem primerjala med sabo tudi nukleotidno sestavo mRNK molekul in prišla do ugotovitve, da je razmerje nukleotidov v eGFP molekuli precej drugačno v primerjavi z ostalima dvema, predvsem odstopa uracil, z ekstinkcijskim koeficientom 9,66 in ga zamenja adenin z ekstinkcijskim koeficientom 15,02. Tudi to dognanje še dodatno potrди mojo hipotezo, da je ekstinkcijski koeficient, podan v literaturi, le neka srednja vrednost ekstinkcijskih koeficientov za vse mRNK molekule in se razlikuje glede na nukleotidno sestavo molekule mRNK.

A : 15,02 mM⁻¹ cm⁻¹

G : 12,08 mM⁻¹ cm⁻¹

U : 9,66 mM⁻¹ cm⁻¹

C : 7,07 mM⁻¹ cm⁻¹

	A	G	C	U
eGFP	30,8	25,6	26,0	17,6
mFix4	25,6	25,3	25,6	23,5
saRNK	29,4	25,4	25,0	20,3

Tabela 10: Primerjava razmerij med adeninom, gvaninom, citozinom in uracilom v mRNK

Preko primerjave koncentracij sem prišla do zaključka, da je bila začetna koncentracija vzorčkov (ki sem jih nato redčila), določena za molekule mRNK preko kvantifikacije z UV-Vis spektrofotometrom, napačna. Ker so meritve koncentracij redčenih vzorcev odstopale od pričakovanih, lahko metodo kvantifikacije koncentracij mRNK z UV-Vis spektrofotometrom označim za netočno. Netočnost pripisujem na podlagi razlik v koncentracijah, ki sem jih predpostavila pri redčenju in izmerjenih koncentracijah na UV-Vis spektrofotometru. Ker je bila začetna koncentracija eGFP, mFix4 in saRNK, ki sem jo nato redčila, določena z UV-Vis spektrofotometrom, bi se morale redčene koncentracije ujemati z izmerjenimi na UV-Vis spektrofotometru. Koncentracije, ki so bile določene za molekule mRNK, so zelo visoke, zato velja omeniti pomislek, ali je spektrofotometer pri tako visokih vrednostih še točen. Predvsem pa je na mestu pomislek o ustreznosti uporabe univerzalnega ekstinkcijskega koeficienta $\epsilon_{260} = 40 \text{ (}\mu\text{g/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ na enoto absorbance za molekule mRNK za določanje koncentracij vzorcev s spektrofotometrom.

Metodo kvantifikacije UV-Vis spektrofotometra označim za natančno, saj so bile koncentracije, ki jih je izmeril UV-Vis spektrofotometer, dokaj ponovljive (med sabo se niso drastično razlikovale).

Hipotezo 2 delno potrdim. HPLC metoda in UV-Vis spektrofotometrija sta prikazali rezultate z različnimi količinami, zato direktne primerjave nisem mogla izvesti. Obe metodi pa imata svoje prednosti in slabosti (v različnih pogledih). Glede na te lastnosti izberemo pravilno metodo za določen namen.

Potrebno pa je še poudariti, da lahko preko HPLC metode kvantificiramo tarčno molekulo v čistih ali pa v nečistih vzorcih, saj pravilno izbrana kolona tarčno molekulo loči od drugih, medtem ko lahko z UV-Vis spektrofotometrom kvantificiramo tarčno molekulo samo v čistih vzorcih, saj ni nobenega medija, ki bi tarčno molekulo ločil od ostalih, ali pa se meri vse spojine v raztopini, ki absorbirajo pri določeni valovni dolžini.

11 Literatura

- [1] Esteban Finol, Sarah E. Krul, Sean J. Hoehn, Xudong Lyu, Carlos E. Crespo-Hernández. 2024. The mRNACalc webserver accounts for the N1-methylpseudouridine hypochromicity to enable precise nucleoside-modified mRNA quantification. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, June 2024
- [2] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer. 2002. *Biochemistry*, 5. izdaja. W.H. Freeman. <https://biokamikazi.wordpress.com/wp-content/uploads/2013/10/biochemistry-stryer-5th-ed.pdf>
- [3] "La résilience numérique (suite) : tour d' horizon des applications en ligne européennes." *Artificiellement Intelligent*. April 5, 2025. <https://artificiellementintelligent.wordpress.com/>
- [4] "# 35 The genetic code - protein synthesis." *Biology Notes for A level*. November 6, 2014. <https://biology4alevel.blogspot.com/2014/11/35-genetic-code-protein-synthesis.html>
- [5] Jerome D.G. Comes, Gorben P. Pijlman, Tessy A.H. Hick. 2023. Rise of the RNA machines – self-amplification in mRNA vaccine design. *Trends in Biotechnology*. [https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(23\)00154-3](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(23)00154-3)
- [6] Sartorius BIA Separations. mRNA Analytical Standard mFix4 4000nt (150 µg). [mRNA Analytical Standard mFix4 4000nt \(150 µg\) - Sartorius BIA Separations](https://www.sartorius.com/en/products/mrna-analytical-standard-mfix4-4000nt-150-ug)
- [7] RIBOPRO. Off-the-shelf-mRNA. [Off-the-shelf mRNA - RIBOPRO](https://www.ribopro.com/en/off-the-shelf-mrna)
- [8] Darinka Brodnjak Vončina. 2006. ANALIZNA KEMIJA II. https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/analizna2_gradivo.pdf
- [9] Eva Arnold. "The HPLC system: simply explained." *Lösungsfabrik*. Maj 26, 2017. <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/high-performance-liquid-chromatography/hplc-system-simply-explained>
- [10] Alenka Kocjan. 2012. Validacija spektrofotometrične metode za določanje mangana v jeklu. Univerza v Ljubljani. <https://repozitorij.uni-lj.si/Iskanje.php?type=napredno&lang=slv&stl0=KljucneBesede&niz0=spektrofotometrija>

[11] Jon H. Hardesty, Bassam Attili. 2010. Spectrophotometry and the Beer-Lambert Law: An Important Analytical Technique in Chemistry.

<http://vfilesieux.free.fr/1Seuro/BeerLaw.pdf>

[12] Sartorius BIA Separations. CIMmultus PrimaS. [CIMmultus PrimaS® - Sartorius BIA Separations](#)

[13] Sartorius BIA Separations. CIMmultus Oligo dT18. [CIMmultus® Oligo dT18 \(C12\) - Sartorius BIA Separations](#)

[14] Nishchala Arya. "Key components of Spectrophotometer." ResearchGate. September, 2024. https://www.researchgate.net/figure/Key-components-of-Spectrophotometer-INSTRUMENTATION-OF-A_fig1_383703921