

Infracrvena spektroskopija nukleinskih kiselina

Plejić, Emanuela

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:874965>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Emanuela Plejić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA NUKLEINSKIH KISELINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: doc.dr.sc Adriana Kenđel

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

16. srpnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

28. rujna 2021.

Mentor rada: doc. dr.sc. Adriana Kendel

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Nukleinske kiseline.....	2
2.1.1. <i>Grada i uloga nukleinskih kiselina</i>	<i>2</i>
2.1.2. <i>Funkcija DNA i RNA.....</i>	<i>4</i>
2.2. Infracrvena spektroskopija	5
2.2.1. <i>Osnove infracrvene spektroskopije</i>	<i>5</i>
2.2.2. <i>IR spektrometri.....</i>	<i>7</i>
2.3. Infracrvena spektroskopija nukleinskih kiselina	9
2.4. Primjena infracrvene spektroskopije u dijagnostici karcinoma.....	13
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XVII

§ Sažetak

Zbog uloge prijenosa genetičke informacije i regulacije procesa transkripcije i translacije, deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*, DNA) i ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*, RNA) predmet su mnogih znanstvenih istraživanja. U prvom dijelu rada opisana su glavna svojstva molekula DNA i RNA, prikazane njihove strukture i opisana njihova uloga u stanicama.

Za određivanje strukture nukleinskih kiselina koriste se različite analitičke metode, a jedna od njih je i infracrvena (eng. *infrared*, IR) spektroskopija. U nastavku su iznesene glavne značajke infracrvene spektroskopije, uključujući teorijsku osnovu, pripravu uzoraka za mjerenje i instrumentaciju. Opisana je primjena infracrvene spektroskopije u strukturnoj analizi nukleinskih kiselina. Detaljno su asignirane eksperimentalno dobivene vrpce u IR spektrima nukleinskih kiselina dobivene korištenjem različitih IR tehnika.

U posljednjem dijelu rada opisano je kako se infracrvena spektroskopija nukleinskih kiselina koristi za razlikovanje zdravih stanica od tumorskih i dijagnosticiranje stadija malignih bolesti.

§ 1. UVOD

Nukleinske kiseline DNA i RNA su biomakromolekule koje, iako strukturno vrlo slične, imaju različitu ulogu u biološkim procesima.¹ Glavna uloga molekule DNA je dugotrajno pohranjivanje informacija potrebnih za sintezu pojedinih dijelova stanice, kao što su proteini i molekule RNA. Ribonukleinska kiselina nema ulogu prijenosa genetičke informacije, ali različite vrste RNA neophodne su za pravilnu transkripciju i translaciju gena koje kodira DNA.²

Nastanak karcinoma, odnosno pretvaranje normalne, zdrave stanice u malignu stanicu, objašnjava se modifikacijom gena koji reguliraju rast i diferencijaciju stanica. Postoji vrlo velik broj genetskih promjena koje mogu uzrokovati transformaciju normalnih stanica u maligne i one uglavnom uključuju razne mutacije poput promjena u nukleotidnom slijedu DNA.

Infracrvena spektroskopija je vrsta vibracijske spektroskopije koja se temelji na interakciji tvari i infracrvenog zračenja, pri čemu dolazi do apsorpcije zračenja ako se tijekom vibracija mijenja električni dipolni moment molekule. Dobiveni spektri se najčešće koriste pri određivanju strukture molekula i kemijskog sastava tvari.

S obzirom na mogućnost uvida u detaljne strukturne motive istraživanih molekula pomoću IR spektroskopije i činjenicu da maligne stanice imaju drugačiji sastav nukleinskih kiselina u odnosu na zdrave stanice, pomoću infracrvenih spektara RNA i DNA može se razlikovati zdrava stanica od tumorske stanice. Infracrveni spektri nukleinskih kiselina dobiveni iz zdravih i malignih stanica mogu poslužiti za određivanje stupnja razvoja karcinoma, s obzirom da je opaženo da je omjer DNA/RNA u tumorskim stanicama veći u odnosu na zdrave stanice.³ To opažanje može značajno pomoći u primjeni infracrvene spektroskopije nukleinskih kiselina u medicinskoj dijagnostici.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Nukleinske kiseline

2.1.1. Građa i uloga nukleinskih kiselina

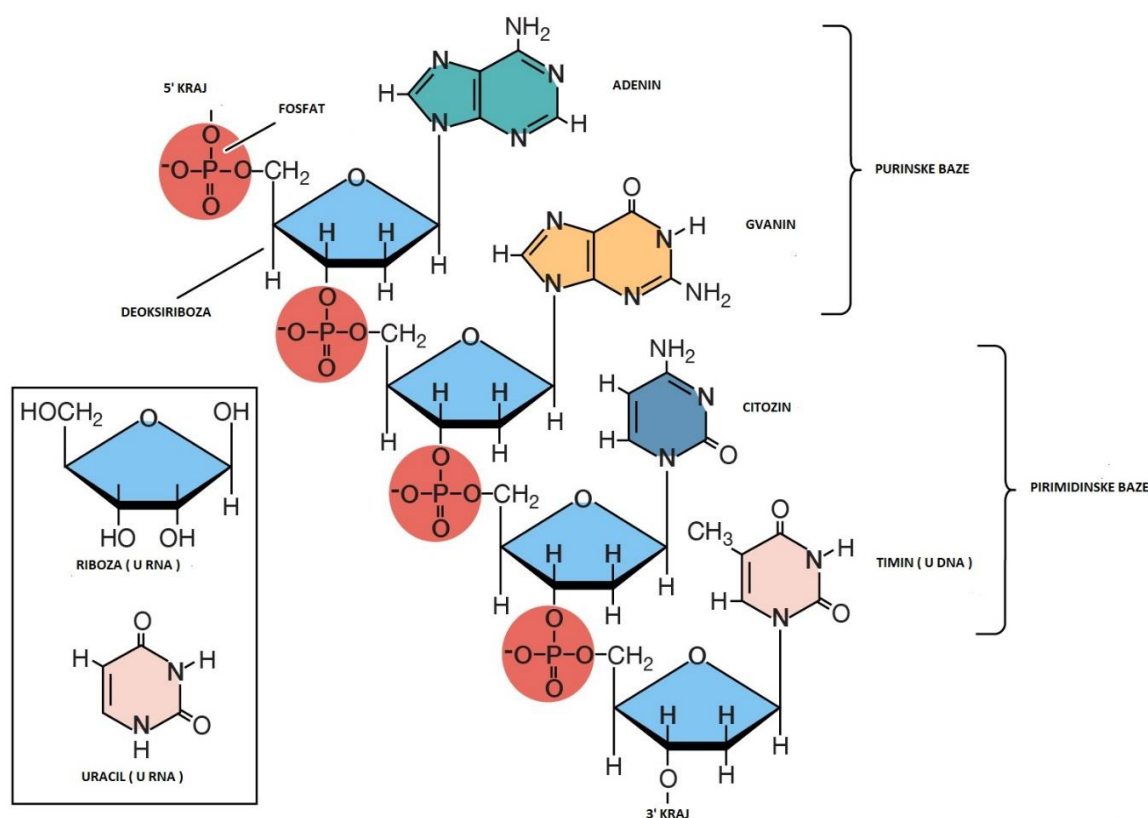
Nukleinske kiseline su biopolimeri koji se sastoje od niza monomera nukleotida povezanih fosfodieterskom vezom. Svaki nukleotid se sastoji od šećera pentoze, fosfata i dušične baze.^{1,2} Fosfatna skupina vezana je za pentozu 5' ugljikovim atomom. Prvi nukleotid u slijedu na 5' ugljikovom atomu sadrži vezani trifosfat, dok svi ostali nukleotidi u slijedu sadrže fosfat. Molekule pentoze se preko fosfodieterske veze povezuju u lanac polinukleotida. Asimetrični završetci DNA se nazivaju 5' i 3' krajevi. Početkom dvostruke zavojnice DNA smatra se 5' kraj, odnosno kraj na kojem se nalazi slobodna fosfatna skupina.

Šećer pentozna koji gradi nukleinske kiseline je riboza kod RNA, dok se u DNA nalazi deoksiriboza. Deoksiriboza je slične strukture kao riboza, ali joj nedostaje hidroksilna skupina na 2' ugljikovom atomu. Zbog spomenute hidroksilne skupine, nukleotidi RNA podložni su alkalnoj hidrolizi. Molekule šećera koje grade DNA i RNA su derivati furanoze i nisu planarni, već se u prostoru najčešće nalaze u konformaciji „stolice“ gdje se dva susjedna atoma nalaze van ravnine, jedan ispod, a drugi iznad ravnine.

Dušične baze koje su N-glikozidnom vezom povezane sa šećerom su heterociklički spojevi koji se dijele u dvije skupine, purinske i pirimidinske baze. DNA grade purinske baze adenin i gvanin te pirimidinske baze timin i citozin, dok se u molekuli RNA, uz adenin, gvanin i citozin, umjesto timina nalazi pirimidinska baza uracil. Timin i uracil se razlikuju u metilnoj skupini na C5 atomu, koja nedostaje u strukturi uracila (slika 1).

U živim organizmima DNA se nalazi u obliku dvostruke uzvojnice, gdje se dva polinukleotidna lanca suprotnog smjera uvijaju jedan oko drugog, a međusobno su povezani vodikovim vezama koje nastaju između purinskih baza jednog lanca i pirimidinskih baza antiparalelnog lanca. Takvo sparivanje naziva se komplementarno sparivanje baza. Adenin i timin su povezani dvijema vodikovim vezama, dok između gvanina i citozina nastaju tri vodikove veze. Kod sparivanja baza u RNA, adenin se dvijema vodikovim vezama komplementarno sparuje s uracilom.

Uvijanjem antiparalelnih polinukleotidnih lanaca DNA uzvojnice nastaju veliki i mali utor. Utori su nejednake veličine zato jer glikozidne veze nisu dijametralno suprotne jedna drugoj pa svaki par baza ima veću stranu koja predstavlja veliki utor i manju stranu koja čini mali utor. U svakom utoru postoje mjesta za stvaranje vodikovih veza, bilo da je to heteroatom dušične baze ili vodikov atom. Molekule koje se vežu u utore DNA stvaraju specifične interakcije preko opisanih vodikovih veza u utorima.



Slika 1. Građa DNA i RNA.

Deoksiribonukleinska kiselina javlja se u različitim strukturnim oblicima, a najvažnije su tri konformacije: A-DNA, B-DNA i Z-DNA. B-DNA je najučestaliji strukturni oblik koji se nalazi u stanicama živih bića. B-DNA je desna uzvojnica i dušične baze su položene gotovo okomito na os uzvojnice. Zavojnica sadrži deset parova po okretu. A-DNA je također desna uzvojnica, kompaktnija i zbijenija od B konformacije te joj parovi baza stoje pod kutem od oko 20° s obzirom na okosnicu zavojnice. Ta se konformacija vrlo rijetko pojavljuje i to u uvjetima niske vlažnosti. Z-DNA je lijeva uzvojnica u kojoj su fosfati naizmjenice poredani i nastaje vrlo kratko tijekom transkripcije DNA. Za razliku od DNA, RNA je sklona različitim nelinearnim strukturnim formama, pa se tako, primjerice, prijenosna RNA javlja u obliku djeteline.

2.1.2. Funkcija DNA i RNA

Deoksiribonukleinska kiselina sadrži genetičke upute neophodne za razvoj i funkcioniranje svih živih bića. Parovi baza omogućavaju kopiranje genetske informacije procesom replikacije postojeće nukleinske kiseline pri čemu nastaje novi lanac DNA. Dijelovi molekule DNA koji nose genetske informacije nazivaju se genima.

Transkripcijom DNA u stanici dolazi do nastajanja jednolančane molekule RNA.^{1,6} U stanici postoje četiri vrste RNA molekula koje imaju različite funkcije, a to su: ribosomska RNA (eng. *ribosomal RNA*, rRNA), prijenosna RNA (eng. *transfer RNA*, tRNA), glasnička RNA (eng. *messenger RNA*, mRNA) i male jezgrine RNA (eng. *small nuclear RNA*, snRNA). rRNA je sastavni je dio ribosoma, obuhvaća oko 80 % ukupne RNA u stanici i čini glavnu komponentu na kojoj se odvija proces sinteze proteina (translacija). Oko 15 % ukupne RNA čini tRNA. Ona sudjeluje u prijenosu aktiviranih aminokiselina do ribosoma gdje dolazi do sinteze proteina. mRNA čini tek oko 5 % ukupne RNA, a služi kao kalup za sintezu proteina u procesu translacije. U snRNA ubrajaju se male RNA molekule koje se nalaze u jezgri. Imaju ulogu u nizu važnih procesa, kao što su procesiranje mRNA i održavanje krajeva kromosoma (telomera).

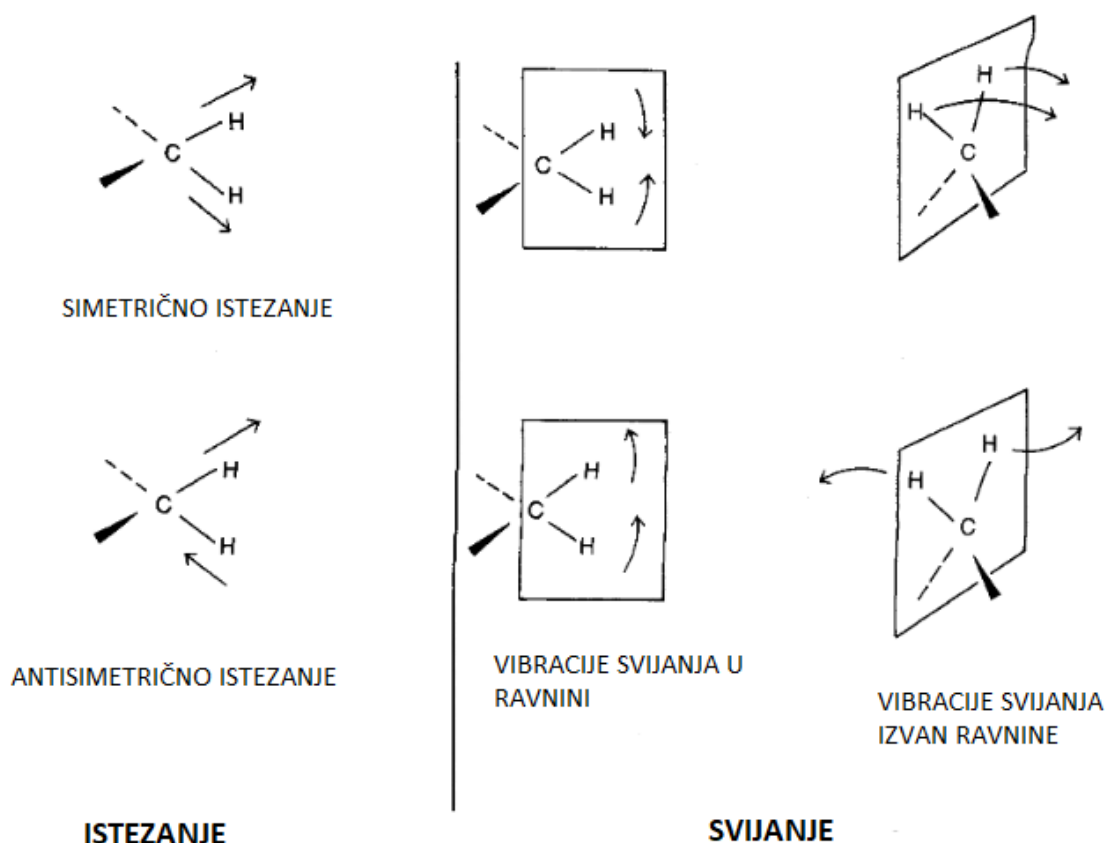
Molekula DNA umnaža se tako da se od od svakog roditeljskog lanca stvara novi, njemu komplementaran lanac. Roditeljski lanac služi kao kalup za replikaciju te, iako sama replikacija ide u 5'-3' smjeru, zapisuje se u 3'-5' smjeru. Sintetizirani, novonastali DNA lanac zadržava 5'-3' smjer. U samom procesu replikacije sudjeluje niz proteina i enzima poput DNA polimeraze koja katalizira sintezu novog DNA lanca (komplementarnog roditeljskom), helikaze koja raspliće roditeljske lance ili ligaze koja popunjava eventualno nastale praznine u DNA lancu. SSB (eng. *single strand binding*) proteini služe za stabilizaciju jednolančanih DNA koje nastaju rasplitanjem roditeljske DNA zavojnice, dok RNA polimeraza katalizira sintezu klice, odnosno početnice na kojoj će započeti sinteza novog lanca DNA. Nakon replikacije slijedi transkripcija u kojoj se pomoću DNA-ovisne RNA polimeraze sintetizira lanac mRNA koji je komplementaran lancu kalupu te se zapisuje u 5'-3' smjeru. Nakon transkripcije slijedi translacija u kojoj se pomoću tRNA i rRNA te ribosoma stvaraju proteini. Vidljivo je da RNA, iako ne prenosi genetsku informaciju, ima značajnu ulogu u sintezi proteina i njezini brojni oblici zaslužni za regulaciju opisanog sintetskog puta.^{4,1}

2.2. Infracrvena spektroskopija

2.2.1. Osnove infracrvene spektroskopije

Infracrvena spektroskopija je spektroskopska metoda kojom se proučavaju interakcije tvari i elektromagnetskog zračenja u infracrvenom području spektra. Područje infracrvenog zračenja obuhvaća područje između $0,78 \mu\text{m}$ i $1000 \mu\text{m}$, odnosno između $13000\text{--}10 \text{ cm}^{-1}$ te se dijeli se na tri dijela: blisko (eng. *near infrared*, NIR), srednje (eng. *mid infrared*, MIR) i daleko (eng. *far infrared*, FIR) infracrveno zračenje. Blisko infracrveno zračenje obuhvaća područje valnih brojeva između 1300 i 4000 cm^{-1} , srednje između 4000 i 400 cm^{-1} , a daleko između 400 i 10 cm^{-1} . Infracrveno zračenje nema dovoljno energije da bi se molekula pobudila u više elektronsko stanje, već se samo induciraju prijelazi između vibracijskih i rotacijskih stanja u osnovnom elektronskom stanju molekule. Molekula će apsorbirati infracrveno zračenje samo ako tijekom vibracije dolazi do promjene električnog dipolnog momenta molekule. Asporpcijom infracrvenog zračenja nastaju spektri koji se koriste za strukturnu karakterizaciju tvari.⁴

Vibracije se mogu opisati kao gibanje kod kojih se mijenja relativan položaj atoma u molekuli i dijele se na istežne vibracije (ν) i vibracije svijanja ili deformacije (δ). Istežne vibracije opisuju se kao promjena međuatomske udaljenosti duž osi kemijske veze i mogu biti simetrične i antisimetrične (slika 2). Kod simetričnog istežanja (ν_s) jezgre atoma se istovremeno približavaju ili udaljavaju od centra mase molekule, dok se kod antisimetričnih vibracija istežanja (ν_{as}) jedna jezgra približava, a druga udaljava od centra mase. Pri vibracijama svijanja dolazi do promjene kuta između dviju kemijskih veza i one se dijele na deformacije u ravnini (eng. *in plane*, δ_{ip}) i deformacije van ravnine (eng. *out of plane*, δ_{oop}). Kod troatomnih skupina poput --CH_2 , svijanje u ravnini se dijeli na striženje (eng. *scissoring*, *sc*) i zibanje (eng. *rocking*, *rc*), dok se deformacije van ravnine dijele na klaćenje (eng. *wagging*, *wg*) i uvijanje (eng. *twisting*, *tw*). Nelinearne molekule imaju $3N\text{--}6$ načina vibriranja, a linearne $3N\text{--}5$, gdje je N broj atoma u molekuli. Slobodni atomi ne apsorbiraju IR zračenje.⁴⁻⁶



Slika 2. Prikaz različitih oblika istezanja i savijanja molekule

Za identifikaciju i određivanje strukture tvari najčešće se snimaju spektri u srednjem infracrvenom području ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), gdje se javljaju karakteristične vrpce istezanja funkcionalnih skupina organskih spojeva između 4000 i 1100 cm^{-1} i to se područje naziva „područje funkcionalnih skupina“. Ispod 1100 cm^{-1} u spektrima se nalazi velik broj vrpce koje odgovaraju vibracijama svijanja skupina te torzijama molekulske okosnice i to područje se naziva „područje otiska prsta“ jer je karakteristično i jedinstveno za svaki spoj.

Svaku apsorpcijsku vrpcu u IR spektru određuju tri parametra: položaj, intenzitet i širina vrpce. Položaj vrpce određen je energijom apsorbiranog zračenja i ovisi o konstanti veze te reduciranoj masi atoma u molekuli. Sve što utječe na konstantu veze, poput elektronskih efekata, steričkih efekata i vodikovih veza, izravno će utjecati na položaj apsorpcijske vrpce. Širina vrpce u spektru ovisi o agregatnom stanju spoja, o temperaturi, elektronskim efektima i drugim parametrima. Intenzitet vrpce ovisi o promjeni dipolnog momenta vibracije. Veličine koje opisuju intenzitet vrpce su apsorpcija ili transmitancija. IR spektar uobičajeno pokazuje

ovisnost apsorbancije ili transmitancije o valnom broju vibracije. Pridruživanje vibracija određenih dijelova molekule vrpčama naziva se asignacija spektra.

Pomoću infracrvene spektroskopije mogu se analizirati uzorci svih agregacijskih stanja. Plinoviti uzorci snimaju se u posebno dizajniranim ćelijama. Tekući se uzorci snimaju u kivetama gdje se otopina uzorka u organskom otapalu smješta između dviju pločica tvari koje su propusne za IR zračenje poput NaCl, KBr, CaF₂. Između pločica stavlja se prsten koji određuje debljinu sloja otopine, odnosno, duljinu puta zračenja kroz uzorak. Kruti se uzorci najčešće snimaju u obliku pastile ili suspendirani u parafinskom ulju. Kod pripreme pastile, najčešće se koristi kalijev bromid koji se miješa s uzorkom u omjeru 1/100 (1 mg uzorka i 100 mg KBr), nakon čega se smjesa preša u tanku pastilu debljine 1 mm. Kada se koristi suspenzija, par mg uzorka se miješa s kapi parafinskog ulja i nastala suspenzija se nanosi između dvije pločice NaCl.

Svaka molekula ima jedinstven IR spektar i usporedbom spektra nepoznatog spoja sa spektrom poznate molekule, moguće je odrediti koje funkcionalne skupine sadrži nepoznata molekula. Dakle, IR spektroskopija daje informaciju o čistoći i strukturnim obilježjima istraživane molekule.

2.2.2. IR spektrometri

Uređaj koji se koristi u infracrvenoj spektroskopiji za dobivanje spektara naziva se IR spektrometrom. Najvažniji dio spektrometra je spektralni uređaj kojim se odvaja zračenje iz određenog područja elektromagnetskog spektra. U IR spektroskopiji koriste se dvije izvedbe spektrometra: disperzijski i FT spektrometar. U disperzijskim spektrometrima za selekciju valnih duljina koriste se prizme ili rešetke, dok u FT spektrometrima spektralno razlaganje zračenja omogućava interferometar.⁴⁻⁶

Osim spektralnog uređaja, svaki IR spektrometar se sastoji od izvora zračenja, optičkog sustava, prostora za uzorak i detektora.

Kao izvor zračenja za pobuđivanje uzoraka u IR spektroskopiji koriste se većinom termički izvori, poznatiji i kao „crna tijela“, koji zagrijavanjem pri određenoj temperaturi emitiraju intenzivno IR zračenje. Termički izvori za srednje IR područje su silicijev karbid (Globar) i Nernstov štapić (cirkonijski(IV) oksid s dodatkom itrijeva(III) oksida). Za NIR se koristi volfram-halogen žarulje, a za daleko infracrveno područje se koristi visokotlačna živina žarulja.

Detektori se koriste za pretvorbu optičkog signala u električni signal i u IR spektroskopiji razlikujemo termičke detektore i fotodetektore. Kod termičkih detektora svojstva se mijenjaju ovisno o promjeni temperature koja je posljedica apsorpcije zračenja. Kod fotodetektora signal je posljedica interakcije fotona i poluvodičkih materijala.

Osnovni dio disperzijskog IR spektrometra je monokromator koji se sastoji od ulazne i izlazne pukotine, optike i disperzijskog elementa. Pri odabiru valnih duljina položaj monokromatora se kontinuirano mijenja pri čemu se intenzitet signala zapisuje valni broj po valni broj.

Moderniji spektrofotometri uglavnom su FT izvedbe. FT-IR spektrometri temelje se na principu interferencije zračenja dviju zraka pri čemu nastaje interferogram. Interferogram je funkcija razlike u duljini puta između dvije zrake. Domena udaljenosti i domena frekvencije pretvaraju se jedna u drugu metodom Fourierove transformacije. Za razlaganje zračenja koristi se Michelsonov interferometar. Interferometar se sastoji od dva okomito položena zrcala i djelitelja zrake između njih. Na djelitelju zrake 50 % upadnog zračenja se propušta prema pokretnom zrcalu, a 50 % prema nepokretnom zrcalu. Zrake reflektirane od zrcala vraćaju se na djelitelj zrake, gdje ovisno o pomaku pokretnog zrcala, interferiraju. Svaki pomak zrcala odgovara određenom valnom broju. Najveće prednosti FT-IR spektrometra nad disperzijskim spektrometrom je bolji odnos signal/šum, intenzivniji signali, bolja preciznost položaja vrpce te velika brzina snimanja spektara.

2.3. Infracrvena spektroskopija nukleinskih kiselina

Brojna istraživanja bave se analizom strukture DNA u svrhu medicinske dijagnostike, liječenja bolesti ili simptoma te u identifikaciji kemijskih vrsta. Budući da je u DNA sadržan genetički kod, tehnike koje koriste sekvenciranje DNA dugo su se koristile za analizu strukture DNA. Međutim, budući da su takve tehnike vremenski dugotrajne i zahtijevaju posebne vještine analize, javlja se potreba za metodom koja bi omogućila brze i točne rezultate analize strukture molekule DNA.

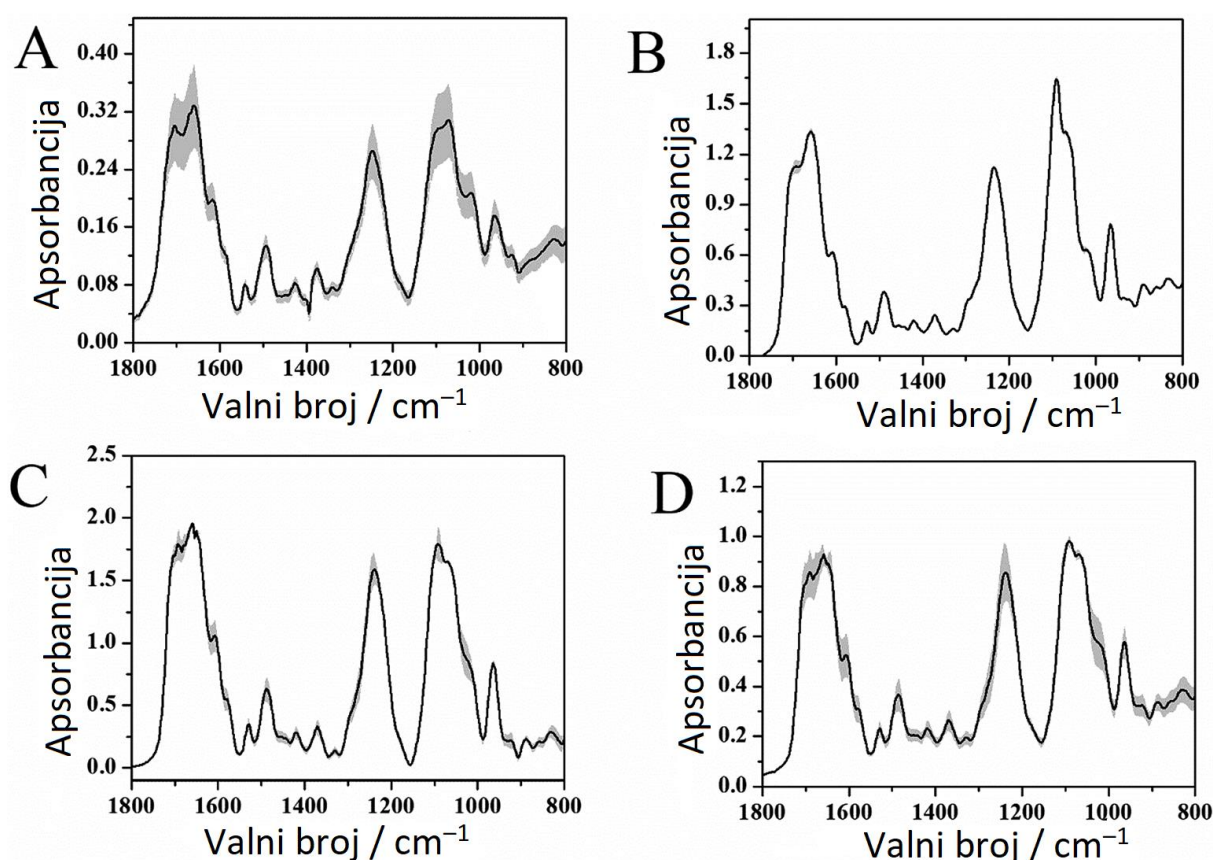
FT-IR spektroskopija vrlo je jednostavna, brza i vrlo često nedestruktivna metoda što je vrlo važno kada se radi o analizi uzorka koji se teško dobivaju u većim količinama, poput DNA. Ovom metodom moguće je uočiti suptilne razlike u strukturama cijelih molekula DNA ili različitim dijelovima jedne molekule DNA. Te se razlike očituju u obliku, visini i širini apsorpcijskih vrpce različitih funkcijskih skupina molekule nukleinske kiseline.

Proučavan je utjecaj različitih tehnika uzorkovanja u IR spektroskopiji na spektar DNA izoliran iz telećeg timusa (eng. *calf thymus DNA*, ct-DNA). Uspoređeni su položaji i intenziteti apsorpcijskih maksimuma te ponovljivost i točnost mjerenja. Posljednja dva parametra određuju se računanjem standardnog odstupanja (SD) te usporedbom apsorpcijskih spektara.² Uzorci DNA pripremani su kao KBr pastila (KBr-FTIR), kao osušeni tanki sloj na pločici cinkova selenida za mjerenja IR mikroskopom (Mikro-FTIR-točka i Mikro-FTIR-slika) i osušeni sloj na pločici za visoko propusnu IR spektroskopiju (HT-FTIR).⁷

Na slici 3 prikazani su spektri dobiveni različitim načinima pripreme uzorka za snimanje IR spektara ct-DNA. U tablici 1 prikazane su uočene vrpce u IR spektrima i dana je njihova asignacija. U području između 1800 i 1500 cm^{-1} javljaju se vrpce koje potječu od vibracijskih modova purinskih i pirimidinskih prstenova. Tako se vrpca istezanja C=O veze timina javlja oko 1660 cm^{-1} dok se vibracije u ravnini baze adenina javljaju kod 1610 cm^{-1} . Vibracije prstenova adenina i gvanina javljaju se oko 1490 cm^{-1} .

Vibracije šećer-dušična baza doprinose vrpcama u području između 1500 i 1250 cm^{-1} . Tu se posebno ističe intenzivna vrpca oko 1240 cm^{-1} koja se pripisuje antisimetričnoj vibraciji fosfata A konformacije ct-DNA.

U trećem području valnih brojeva između 1200 i 800 cm^{-1} nalaze se vrpce istezanja deoksiriboze te vibracije fosfatnih skupina. Intenzivna vrpca pri 1090 cm^{-1} odgovara simetričnom istezanju P–O veze iz fosfatne skupine okosnice, dok se vrpca pri 960 cm^{-1} pripisuje svijanju O–P–O skupine.



Slika 3. Usrednjeni spektri ct-DNA prikazani sa standardnim odstupanjem intenziteta najintenzivnije vrpce u području 1800–800 cm⁻¹, dobiveni različitim načinima pripreve i tehnikama snimanja a) KBr-FTIR metoda, b) HT-FTIR metoda, c) metoda Mikro-FTIR-točka i d) metoda Mikro-FTIR-slika.

Apsorpcijski maksimumi pri 1700, 1425 i 1240 cm⁻¹ posljedica su konformacijskog prijelaza DNA molekule iz B u A konformaciju, koji je vjerojatno uzrokovan povišenjem temperature. Primijećeno je da su intenziteti vrpce najsnažniji kod Mikro-FTIR tehnike, vrlo vjerojatno zbog mogućnosti usmjeravanja infracrvenog zračenja na jako malo područje uzorka. Najslabiji signali opaženi su kod KBr-FTIR tehnike (tablica 2). U toj tehnici koristi se detektor od deuteriranog triglicin sulfata (DTGS) koji je manje osjetljiv detektor od živinog kadmijevog telurida (MCT) koji se koristi u ostalim FTIR tehnikama. Osim toga, važan čimbenik jest i otapanje kalijevog bromida koji može rezultirati slabijim intenzitetima vrpce nego kod ostalih metoda, budući da se u ostalim tehnikama koristi suhi film DNA. Najveća sličnost u IR spektrima opažena je kod Mikro-FTIR-slika tehnike, a slijedi ju HT-FTIR. Najmanja sličnost

među spektrima dobivena je Micro-FTIR-točka metodom (tablica 2). Ako se uzmu u obzir svi promatrani čimbenici iz tablice 2, HT-FTIR metoda pokazala se optimalnom za snimanje infracrvenih spektara deoksiribonuklinske kiseline.

Tablica 1. Vrpce ct-DNA dobivene u IR spektrima različitim načinima pripreve uzoraka za mjerenje.

ASIGNACIJA	OPIS	Valni broj / cm^{-1}				
		KBr-FTIR	HT_FTIR	Mikro-FTIR-točka	Mikro-FTIR-slika	Standardni spektar
Timin/G-z oblik	istezanje veze C2=O	1703	1692	1692	1690	
Timin	istezanje veze C2=O	1661	1659	1660	1658	
Adenin	vibracija baza/ ravnina prstena	1615	1608	1608	1606	1603
Citozin, gvanin	vibracija baza/ ravnina prstena	1525	1529	1530	1529	1532
Adenin, gvanin	vibracija prstena, C=N	1494	1489	1488	1486	1482
Citozin, gvanin	vibracija baza/ ravnina prstena	1425	1420	1420	1419	1418
Adenin, gvanin	A, B forma, dA, dG	1375	1372	1371	1369	1370
Okosnica A forme DNA	antisimetrična vibracija fosfata	1247	1235	1238	1238	1215
Okosnica	simetrična vibracija fosfata	1088	1090	1092	1091	
Deoksiriboza	svijanje veze O-P-O	1069	1070	1070	1068	1055
Okosnica	vibracija prstena deoksiriboze	965	966	964	964	961
Deoksiriboza	deoksiriboza-fosfat	889	889	888	886	884
Deoksiriboza	deoksiriboza-fosfat	828	833	831	829	822
DNA-šećer		787	782	783	783	781

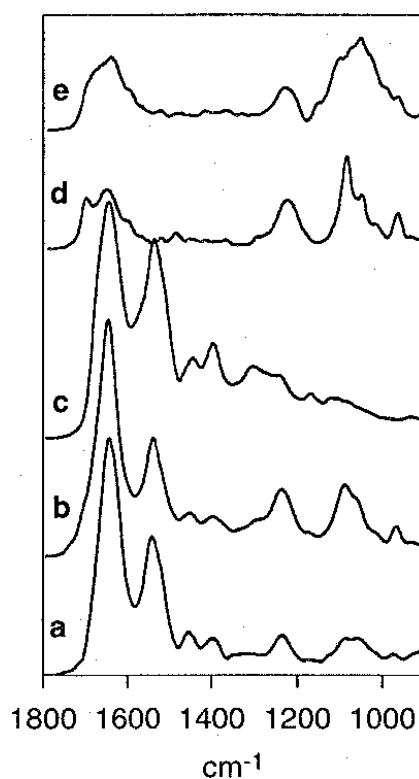
Tablica 2. Vrijednosti najvećeg intenziteta apsorpcijskih vrpca, srednje vrijednosti standardnog odstupanja i sličnosti spektara za četiri FT-IR metode.

TEHNIKA UZORKOVANJA ZA FT-IR	DETEKTOR	BROJ SNIMLJENIH SPEKTARA	NAJVEĆI INTENZITET (1800- 800 cm⁻¹)	MEDIJAN STANDARDNIH ODSTUPANJA INTENZITETA	SPEKTRALNA SLIČNOST (%)
KBr-FTIR	DTGS	64	0,3284	0,0156	93,23
HT-FTIR	MCT	64	1,6464	0,0138	95,07
Mikro-FTIR-točka	MCT	64	1,9592	0,077	92,37
Mikro-FTIR-slika	MCT	16	0,9808	0,0552	96,75
KBr-FTIR	DTGS	64	0,3284	0,0156	93,23
HT-FTIR	MCT	64	1,6464	0,0138	95,07
Mikro-FTIR-točka	MCT	64	1,9592	0,077	92,37
Micro-FTIR-slika	MCT	16	0,9808	0,0552	96,75

2.4. Primjena infracrvene spektroskopije u dijagnostici karcinoma

U prijašnjim istraživanja FT-IR spektroskopije normalnih i neoplastičnih, odnosno tumorskih stanica, opažene su razlike u apsorpcijskim spektrima u intenzitetu i obliku apsorpcijskih vrpca. U ovom radu pokušalo se utvrditi što utječe na razliku u IR spektrima normalnih i neoplastičnih stanica. U istraživanju su bili uspoređeni limfociti pacijenata koji boluju od B-kronične limfne leukemije i limfociti zdravih ljudi.³

Snimljeni su FT-IR spektri zdravih limfocita i limfocita kod leukemije te nukleinskih kiselina i albumina izoliranog iz ljudskog seruma (slika 4).

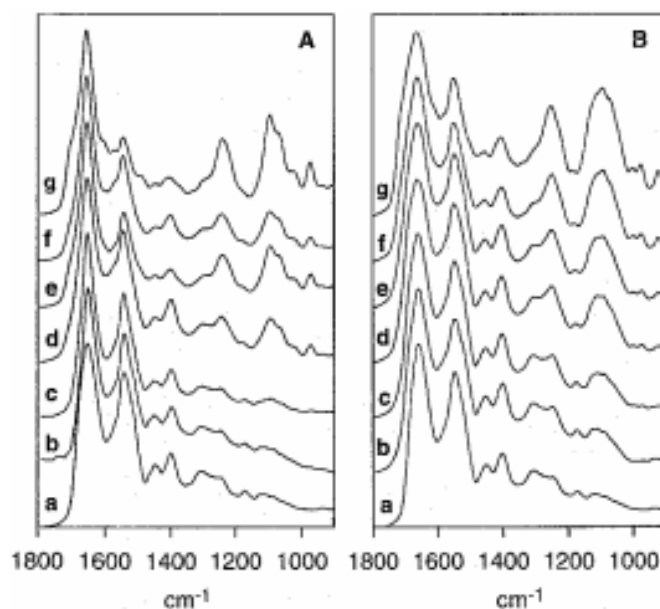


Slika 4. FT-IR spektri a) normalni limfociti, b) limfociti kod leukemije, c) albumin iz ljudskog seruma, d) DNA i e) RNA:

Vidljivo je da proteini općenito imaju slabe vrpce u području između 1300 i 1190 cm⁻¹ i ne pokazuju apsorpcijske maksimume između 1190 i 700 cm⁻¹. Upravo u tim područjima nalaze se vibracije veze šećer-fosfat u nukleinskim kiselinama. Postojanje takvih područja u apsorpcijskom spektru, koja ukazuju da postoje određene funkcionalne skupine u smjesi, omogućuje definiranje omjera proteina i nukleinskih kiselina u smjesama. Iako i RNA i DNA

imaju aktivne IR vrpce u rasponu od 1300 do 900 cm^{-1} , zbog različitog oblika apsorpcijskih vrpce, moguće ih je razlikovati u FTIR spektru.

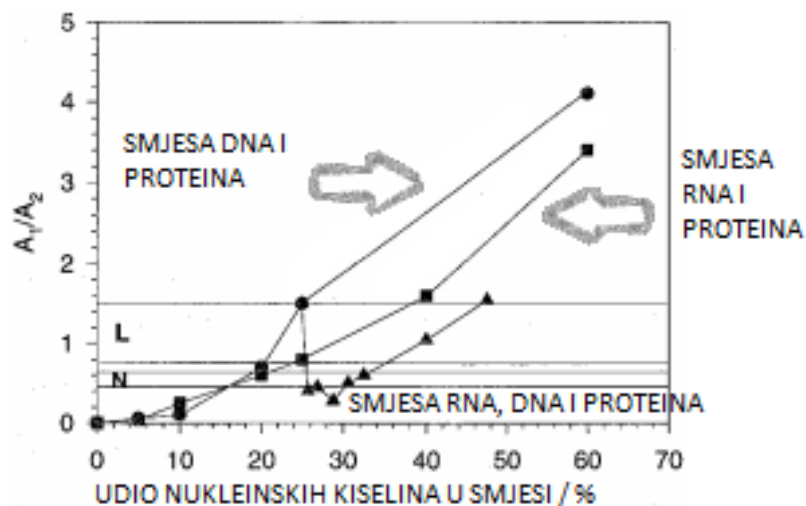
Snimljeni su infracrveni spektri smjesa različitih omjera nuklinskih kiselina i proteina albumina (slika 5).



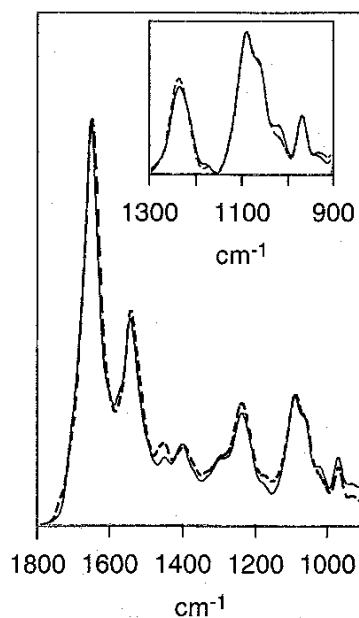
Slika 5. FT-IR apsorpcijski spektri smjesa DNA/protein (A) i RNA/protein (B) s različitim udjelima nukleinskih kiselina i proteina: a) 100% HSA b) 5% nukleinska kiselina/95% HSA c) 10% nukleinska kiselina/90% HSA d) 20% nukleinska kiselina/80% HSA e) 25% nukleinska kiselina/75% HSA f) 50% nukleinska kiselina/50% HSA g) 60% nukleinska kiselina/40% HSA.

Za promatranje promjena u spektrima različitih omjera nukleinske kiseline i proteina koristi se omjer integriranih područja vrpce kod 1080 cm^{-1} (A1) koja odgovara simetričnom istežanju fosfatne skupine u DNA, te vrpce kod 1540 cm^{-1} (A2) koja odgovara amid II vrpce proteina. Izvedeni parametar A1/A2 pokazao se izvrsnim za određivanje relativnih količina nukleinskih kiselina u odnosu na proteine (slika 6). Pokazano je odlično slaganje između apsorpcijskih spektara neoplastičnih stanica s apsorpcijskim spektrima napravljenima na uzorcima koji se sastoje od serumskog albumina u udjelu od 75% te DNA u udjelu od 25% (slika 7). Dodatak RNA u malim količinama, od 1 do 5 %, u smjese sa 75%-tnim udjelom serumskog albumina i 25 %-tnim udjelom DNA, rezultira IR spektrima koji se jako dobro slažu sa spektrima dobivenima iz smjese normalnih limfocita. Pokazano je da je uzrok različitim

apsorpcijskim spektrima između smjesa normalnih i neoplastičnih stanica porast omjera DNA/RNA u neoplastičnim stanicama.³



Slika 6. Ovisnost omjera A_1/A_2 o udjelu nukleinskih kiselina u smjesi nukleinskih kiselina i proteina. N označava zdrave limfocita, L označava limfocite kod leukemije.



Slika 7. IR spektri smjese DNA/protein (25 % DNA i 75 % proteina, puna linija) i limfocita kod leukemije (isprekidana linija).

Iz svega navedenog može se zaključiti da infracrvena spektroskopija nukleinskih kiselina može imati vrlo široku i važnu primjenu. Definiranjem omjera kao što je A1/A2 omogućena je diferencijacija uzoraka koji se razlikuju u masenim udjelima proteina i nukleinskih kiselina. Uzorci s većim omjerom A1/A2 imaju veći omjer nukleinskih kiselina i proteina. Primjena navedenog vidljiva je u diferencijaciji normalnih od malignih stanica. Usporedbom apsorpcijskih spektara normalnih i malignih stanica s uzorcima koji su sadržavali serumski albumin, DNA i RNA u različitim omjerima, zaključeno je da se neoplastične stanice sastoje od proteina (serumski albumin) u udjelu od oko 75% te od DNA u udjelu od oko 25% te da se dodatkom RNA u udjelima od 1% do 5% dobiva IR spektar koji odgovara normalnim, tj. zdravim limfocitima. Na taj je način omogućena diferencijacija zdravih i malignih limfocita te je omogućena vrlo važna primjena infracrvene spektroskopije nukleinskih kiselina u medicinskoj dijagnostici.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. L. Nelson, M. M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, Springer Nature, 2017, str. 273–305.
2. L. Stryer, Biochemistry, W.H. Freeman and Company, New York, 1999., str. 75–93.
3. E. Benedetti, E. Bramanti, F. Papineschi, I. Rossi, E. Benedetti, Appl. Spectrosc., 51 (1997) 792–797.
4. D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, Introduction to Spectroscopy, Thomson Learning, 2001, str. 13–23.
5. <https://microbenotes.com/infrared-ir-spectroscopy/> (datum pristupa: 15.07.2021.)
6. P. R. Griffiths, J. A. Haseh, Fourier Transform Infrared Spectrometry, John Wiley & Sons, 2007, str. 19–55.
7. Y. Han, L. Han, Y. Yao, Y. Li, X. Liu, Anal. Methods, 10 (2018) 2436–2443.