

Měření spektrálních charakteristik a stanovení koncentrace DNA a proteinů

Spektroskopie v UV oblasti umožňuje stanovit koncentraci a čistotu biologických molekul. Molekuly DNA mají absorpční maximum kolem 260 nm, molekuly proteinů kolem 280 nm. Pro přímé spektrální určení koncentrace se využívá Lambert-Beerova zákona pro monochromatické světlo, který lze zapsat ve tvaru $A = c \cdot \epsilon$ za předpokladu, že měříme v 1 cm kyvetě a známe extinkční koeficient ϵ , který má jednotku $[M^{-1}cm^{-1}]$ pro molární koncentraci nebo $[mL \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1}]$ pro koncentraci v mg/mL.

V případě, že neznáme extinkční koeficient, můžeme pro určení koncentrace DNA o vysoké molekulární hmotnosti použít zjednodušeného předpokladu, že roztok dvouřetězcové DNA o absorbanci 1 má koncentrací 50 $\mu g/mL$ a pro převod na molární koncentraci nukleotidu DNA pak vztah $320 \mu g/mL = 1 mM$.

Pro určení koncentrace proteinů spektroskopicky lze využít absorbance proteinů při 280 nm. Jestliže známe primární sekvenci aminokyselin proteinu, lze extinkční koeficient vypočítat <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>. Ze změřené absorbance pak určíme koncentraci proteinu. Znalost extinkčního koeficientu není nutná v případě univerzální Bradfordové metody. **Bradfordová metoda** je v současnosti nejrozšířenější způsob určování koncentrace proteinu. Bradfordová metoda využívá posunu absorpčního maxima „Coomasie Blue“ po vazbě na protein. Za použití kalibrační křivky se známou koncentrací proteinu lze určit skutečnou koncentraci neznámého proteinu nebo směsi proteinů.

Materiál

- DNA (Salmon sperm)
- Oligonukleotid CNF2_Bot (5' GTTATCCTTTGAGGGTTTAG)
- BSA (hovězí sérový albumin; $\epsilon = 0.677 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, MW = 66430)
- TE pufr
- Bradford reagent (BioRad)
- Kyvety a spektrofotometr

DNA

1. Připravte roztok DNA v TE pufru ze zásobního roztoku o přibližné koncentraci 7,5 mg/mL tak, aby bylo možno přesně určit koncentraci DNA.
2. Změřte absorpční spektrum DNA v rozsahu vlnových délek 220 až 350 nm.
3. Určete polohu absorpčního maxima.
4. Stanovte přesnou koncentraci DNA v zásobním roztoku z hodnoty absorbance naředěného roztoku při 260 nm. Koncentraci vyjádřete v mg/mL a v OD/mL.
5. Nařeďte roztok oligonukleotidu v TE pufru ze zásobního roztoku o přibližné koncentraci 0,02 mg/ml tak, aby bylo spektroskopicky možno přesně stanovit jeho koncentraci.
6. Na základě zadané sekvence oligonukleotidu stanovte extinkční koeficient ϵ_{260} a spektroskopicky určete jeho koncentraci.
<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx?c=EU>
7. Porovnejte spektrum oligonukleotidu se spektrem fluorescenčně značeného oligonukleotidu v rozsahu vlnových délek 220 až 600 nm.

Protein

UV spektroskopie

1. Připravte roztok BSA v TE pufru ze zásobního roztoku o přibližné koncentraci 10 mg/mL tak, aby bylo možno přesně určit koncentraci BSA.
2. Změřte absorpční spektrum BSA v rozsahu vlnových délek 240 až 350 nm.
3. Určete polohu absorpčního maxima.
4. Stanovte přesnou molární koncentraci BSA v zásobním roztoku z hodnoty absorbance naředěného roztoku při 280 nm.

Bradfordové metoda

1. Připravte standardní kalibrační křivku pro měření koncentrace proteinu Bradfordové metodou.
2. Změřte koncentraci BSA pomocí této metody.
3. Vezměte roztok reakčního Bradfordové činidla z lednice a nechte jej zahřát na pokojovou teplotu a promíchejte.
4. Připravte roztoky blanku a standardů BSA o celkovém objemu 1 mL do mikrozkušavek tak, že do 980 μ L reakčního Bradfordové činidla přidejte vždy 20 μ L TE pufru nebo 20 μ L 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1 mg/mL a 1.5 mg/mL standardů. Současně připravte stejným způsobem roztok neznámého vzorku.
5. Všechny roztoky dobře promíchejte a nechte inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Inkubace by neměla přesáhnout 1h.
6. Nastavení spektrofotometru
Protein assay – Bradford – STD Curve – Units: mg/ml – tlačítko MORE – Create table – vypsat hodnoty koncentrací standardů od nejmenší – Entry Done
Změřte absorbanci blanku
Změřte absorbanci roztoku standardů. Při měření postupujte od nejnižší koncentrace standardu k nejvyšší. Po posledním standardu se vytvoří kalibrační křivka.
7. Změnit rovnici: Next formula – Entry Done
8. Změřit absorbanci blanku, jednoho standardu (pro kontrolu) a poté neznámého vzorku a pomocí kalibrační křivky určete jeho koncentraci.
9. Porovnejte hodnoty koncentrace zásobního roztoku BSA určené spektroskopicky při 280 nm a pomocí Bradfordové metody.