

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 koncentraci 50 $\mu g/mL$ a pro převod na molární koncentraci nukleotidu DNA pak vztah $320 \mu g/mL = 1 \text{ mM}$.

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; přibližná koncentrace = 7,5 mg/mL)
- Oligonukleotid CNF2_Bot (5' GTTATCCTTTGAGGGTTTAG; přibližná koncentrace = 0,02 mg/mL)
- BSA (hovězí sérový albumin; $\epsilon = 0.677 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, MW = 66430; přibližná koncentrace 5 mg/mL)
- TE pufr, destilovaná voda
- Bradford reagent (BioRad)
- Kyvety a spektrofotometr

DNA

1. Připravte roztok DNA v TE pufru ze zásobního roztoku 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. Naředěte roztok oligonukleotidu v TE pufru ze zásobního roztoku tak, aby bylo spektroskopicky možno přesně stanovit jeho koncentraci.
6. Změřte absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 220 až 600 nm.
7. Nastavení NanoPhotometer:
Functions – Wavescan – nastavte min a max λ – OK – Blank - vzorek
8. 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>
9. Změřte spektrum značeného oligonukleotidu ve stejném rozsahu vlnových délek a porovnejte jej se spektrem neznačeného oligonukleotidu.

Protein

UV spektroskopie

1. Připravte roztok BSA v TE pufru ze zásobního roztoku tak, aby bylo možno přesně určit koncentraci BSA.
2. Změřte absorpční spektrum BSA v rozsahu vlnových délek 240 až 350 nm:
Nastavení přístroje Beckman DU[®]730 :Wavelength Scan – Options – λ – nastavit hodnoty min a max λ – OK – blank - vzorek
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 1mL 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.
5. Současně připravte stejným způsobem roztok BSA ze zásobního roztoku, který jste naředili tak, aby bylo možno přesně určit jeho koncentraci.
6. Všechny roztoky dobře promíchejte a nechte inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Inkubace by neměla přesáhnout 1h.
7. Nastavení spektrofotometru:
Beckman DU[®]530: Protein assay – Bradford – STD Curve – Units: mg/ml – tlačítko MORE – Create table – vypište 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.
Změňte rovnici: Next formula – Entry Done
Beckman DU[®]730: Protein Assay Analysis – Bradford – Start – Standard Curve – Standards Setup - vypište hodnoty koncentrací standardů od nejmenší přes Edit concentration – Done –změřte absorbanci blanku, poté standardů.
Změňte rovnici na Non-linear - Done
8. Změřte 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.