

Absorpční spektroskopie při biologické analýze molekul

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr



UV spektroskopie DNA a proteinů

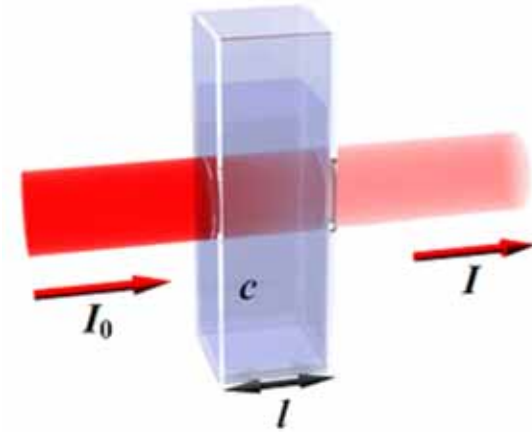
- Všechny atomy absorbují v UV oblasti spektra, protože toto záření má dostatečnou energii k excitaci vnějších elektronů
- UV spektroskopie je používána k určení koncentrace DNA a proteinů a k určení poměru DNA/proteinů v roztoku
- Ke stanovení koncentrace biologických molekul se využívá Lambert-Beerův zákon

Lambert-Beerův zákon

- Látka pohlcuje světlo
- Pro absorpci monochromatického světla
- **Lambert-Beerův zákon:**

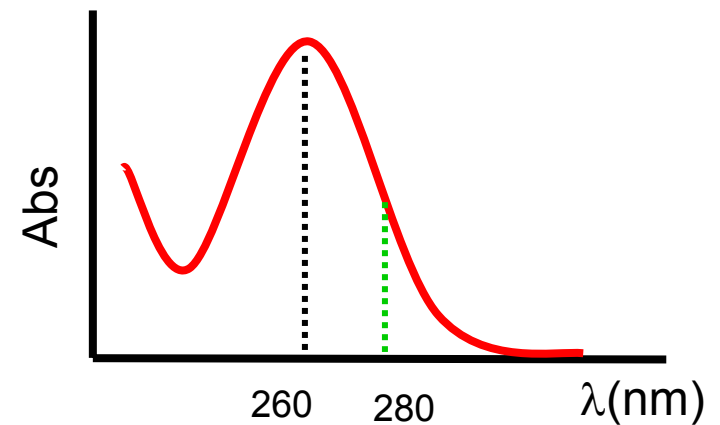
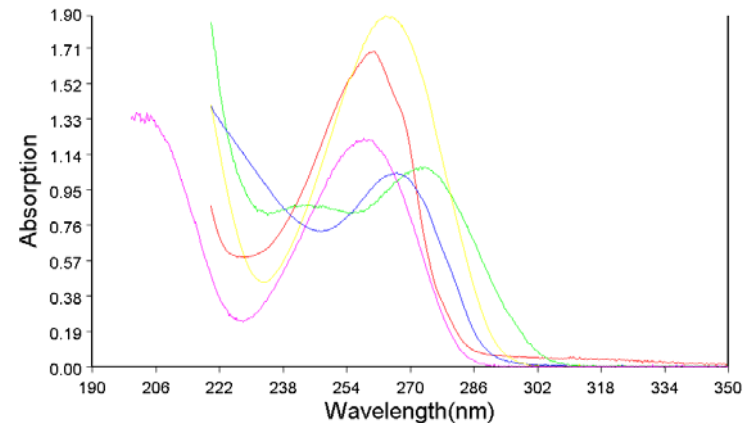
Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$



Absorpční spektrum DNA

- Spektrum DNA je tvořeno příspěvky jednotlivých bazí
- Nejvíce absorbují heterocyklické puriny A,G méně C,T,
- Absorbance DNA se měří v maximu tj. při 260 nm
- Poměr A_{260}/A_{280} je pro čistou DNA 1.8
- Poměr menší než 1.8 ukazuje na přítomnost proteinů nebo nečistot



Přibližné určení koncentrace nukleových kyselin

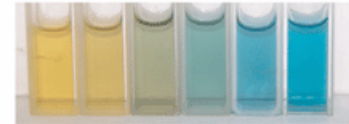
- Jestliže má roztok NK $Abs_{260}=1$ v 1 cm kyvetě, pak je koncentrace
- dvouřetězcové **dsDNA** **50 $\mu\text{g/ml}$**
- jednořetězcové **ssDNA** **30 $\mu\text{g/ml}$**
- jednořetězcové **RNA** **40 $\mu\text{g/ml}$**
- Odtud můžeme vypočítat molární koncentraci pomocí průměrné M_r nukleotidů (320)
- Takto vypočtená koncentrace se vztahuje na 1 nukleotid!
- Pro přepočet koncentrací platí **320 $\mu\text{g/ml} \sim 1 \text{ mM}$**
- **Jedná se molární koncentraci nukleotidů v roztoku!** 5

Určování extinkčního koeficientu oligonukleotidů

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

- **Měřením** – Analytické stanovení
Fosforová analýza
- **Výpočtem** – nejpřesnější na základě
sekvence s uvážením vlivu sousední báze

Fosforová analýza při stanovení koncentrace DNA



- Přesná analytická metoda
- Určuje koncentraci fosfátových skupin
- Před analýzou je nutno štěpit DNA
- Umožňuje určit ϵ také u analogů DNA a při modifikaci DNA např. fluorescenčními značkami
- Využívá kolorimetrie – stupeň zbarvení roztoku je přímo-úměrný množství PO_4 (tj. množství DNA)

Výpočet extinkčního koeficientu DNA

- Extinkční koeficienty jednotlivých bazí přispívají k výslednému ϵ celé DNA podle pravidla nejbližšího souseda
- Interakce sousedních bazí ovlivňují míru absorpce
- Výpočet extinkčního koeficientu oligonukleotidu o délce n nukleotidů

$$\epsilon_{260} = \sum_{n-1}^1 (\epsilon_{\text{nearest neighbor}}) - \sum_{n-1}^2 (\epsilon_{\text{individual}})$$

5'→3'	dA	dC	dG	dT
dA	27,400	21,200	25,000	22,800
dC	21,200	14,600	18,000	15,200
dG	25,200	17,600	21,600	20,000
dT	23,400	16,200	19,000	16,800

$$dA = 15,400, dC = 7,400, dG = 11,500, dT = 8,700$$

Příklad výpočtu

- M13 sekvenační primer 5'- gTA AAA CgA Cgg CCA gTg -3,

Samostatné báze	Nejbližší soused	5'→3'	dA	dC	dG	dT
		dA	27,400	21,200	25,000	22,800
		dC	21,200	14,600	18,000	15,200
dA = 15,400, dC = 7,400, dG = 11,500, dT = 8,700		dG	25,200	17,600	21,600	20,000
		dT	23,400	16,200	19,000	16,800

$$\epsilon_{260} = (\epsilon_{GT} + \epsilon_{TA} + \epsilon_{AA} + \epsilon_{AA} + \epsilon_{AA} + \epsilon_{AC} + \epsilon_{CG} + \epsilon_{GA} + \epsilon_{AC} + \epsilon_{CG} + \epsilon_{GG} + \epsilon_{GC} + \epsilon_{CC} + \epsilon_{CA} + \epsilon_{AG} + \epsilon_{GT} + \epsilon_{TG}) - (\epsilon_T + \epsilon_A + \epsilon_A + \epsilon_A + \epsilon_A + \epsilon_C + \epsilon_G + \epsilon_A + \epsilon_C + \epsilon_G + \epsilon_G + \epsilon_C + \epsilon_C + \epsilon_A + \epsilon_G + \epsilon_T)$$

$$\epsilon_{260} = (20,000 + 23,400 + 27,400 + 27,400 + 27,400 + 21,200 + 18,000 + 25,200 + 21,200 + 18,000 + 21,600 + 17,600 + 14,600 + 21,200 + 25,000 + 20,000 + 19,000) - (8,700 + 15,400 + 15,400 + 15,400 + 15,400 + 7,400 + 11,500 + 15,400 + 7,400 + 11,500 + 11,500 + 7,400 + 7,400 + 15,400 + 11,500 + 8,700)$$

$$= (368\ 000) - (185\ 400)$$

$$= 182\ 800\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Kalkulátory extinkčních koeficientů DNA/RNA oligonukleotidů

Výpočet ϵ

[http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/
OligoAnalyzer/Default.aspx](http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx)

Jednotka optické hustoty OD

OD jednotka optické hustoty („optical density“)

1 OD je množství DNA nebo proteinu, které když se rozpustí v jednom mililitru, má absorbanci 1, jestliže se měří v kyvetě s optickou dráhou 1 cm.

Měření optické hustoty **OD** se často používá v biologii jako jednoduché metody k určení koncentrace, protože v rozsahu 0..1 platí přibližně lineární vztah mezi koncentrací biologického materiálu a hodnotou absorbance.¹¹

Příklad výpočtu koncentrace DNA

$$\varepsilon = 182\,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Celkem po syntéze 8,5 OD₂₆₀

Přidáme 500 ul H₂O

Jaká je molární koncentrace DNA?

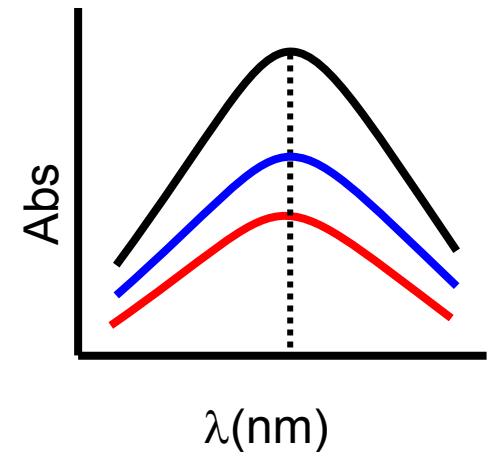
$$c = 93 \text{ } \mu\text{M}$$

Molární koncentrace celých řetězců!

Hypochromní efekt při tvorbě DNA

Snižování absorbance :

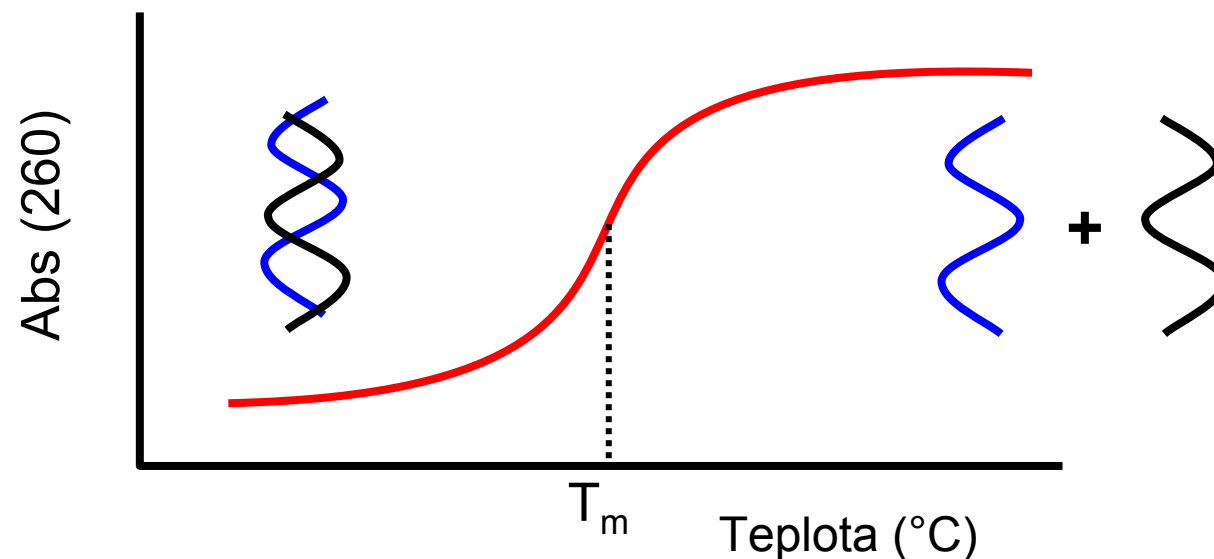
Abs (nukleotidy) > Abs (ssDNA) > Abs (dsDNA)



- Dvouřetězcová DNA absorbuje DNA méně, než jednořetězcová a ta méně než samotné nukleotidy
- Využití: Sledování rozplétání komplementárních řetězců

Sledování tání DNA

- Denaturační křivka DNA - závislost absorbance (260nm) na teplotě
- Teplota tání T_m - teplota, při které je právě polovina molekul zdenaturována



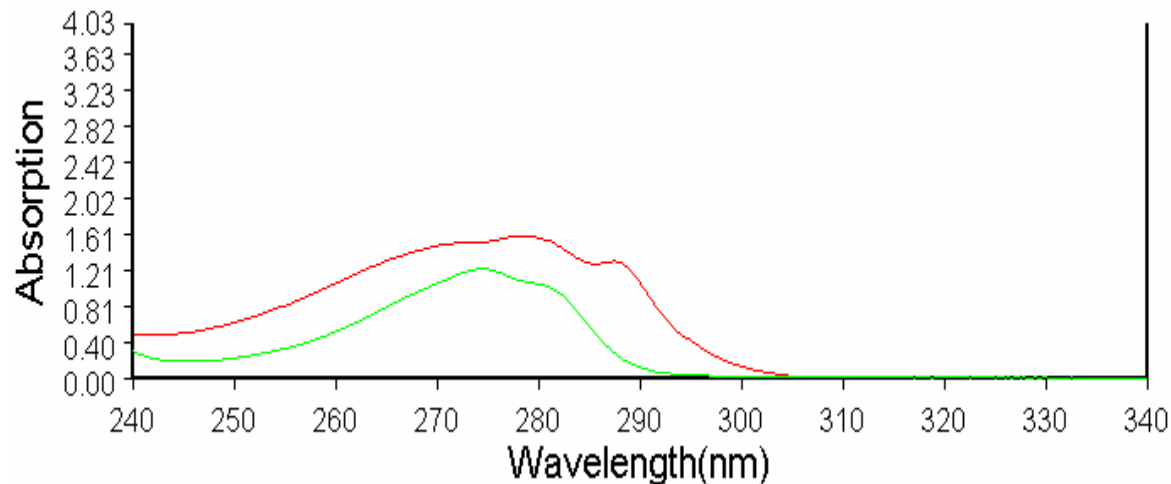
Kalkulátor teplotní stability DNA

Výpočet teploty tání a její závislosti na koncentraci oligonukleotidu a solí

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Absorpční spektrum proteinů

- Spektrum proteinů je tvořeno příspěvkem jednotlivých aminokyselin
- Nejvíce absorbují tryptofan, tyrosin a cystein
- Absorbance proteinu se měří při 280 nm



Spektroskopické stanovení koncentrace proteinu

Analytické určení

Bradfordové metoda - změna absorpčního maxima v přítomnosti proteinu

Výpočet extinkčního koeficientu
na základě sekvence aminokyselin

Bradfordové metoda určování koncentrace proteinu

- Metoda je založena na jevu posunu absorpčního maxima kyselého roztoku Coomasie Brilliant Blue G-250 z 465 nm na 595 nm při vazbě na protein. Změna je způsobena iontovými a hydrofobními interakcemi s proteinem, které stabilizují záporně nabitou formu barviva, což má za následek změnu barvy roztoku.
- Rozsah použití metody je řádově 0.1 – 1.5 mg/ml
- V tomto rozsahu nedochází k výrazné změně extinkčního koeficientu komplexu protein/Coomassie

Bradford, MM. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.

Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69 (1990).

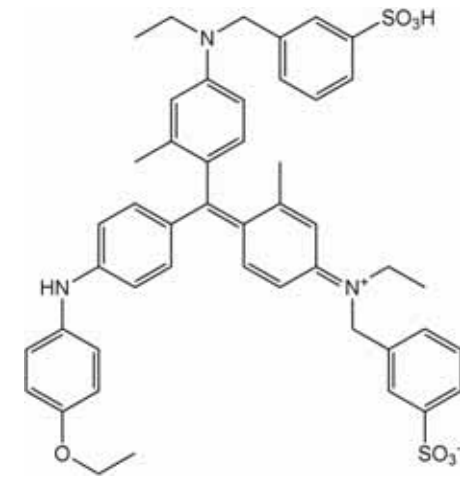
Coomasie

Další názvy:

Coomassie Blue, Brilliant Blue, Brilliant Blue G, Acid Blue 90, C.I. 42655, Brilliant Blue G 250, or Kunasty Blue

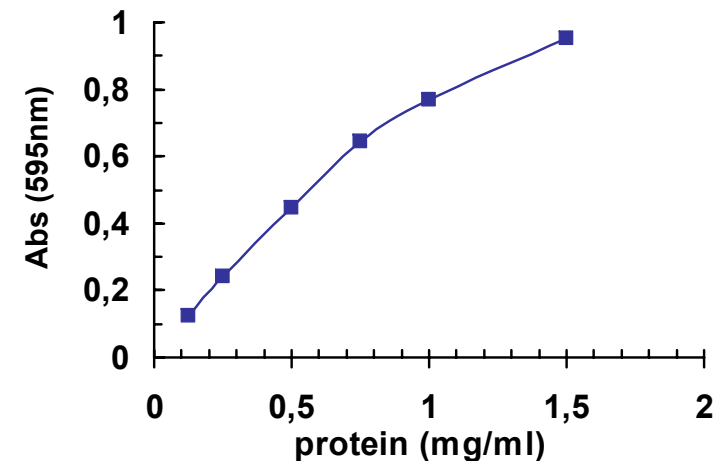
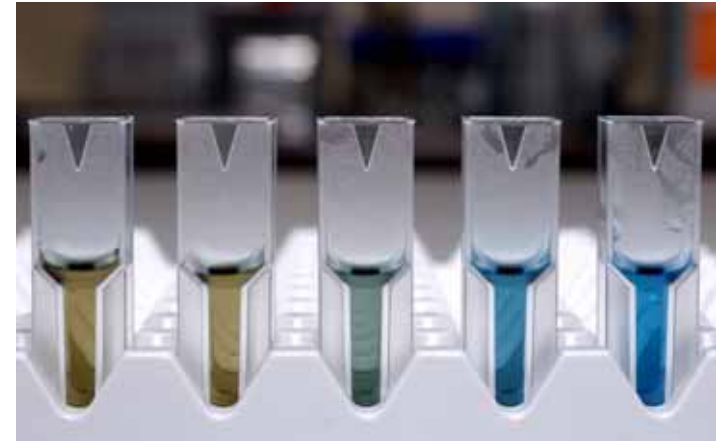
Původně byla tato látka používána v textilním průmyslu k barvení vlny

Jméno podle Afrického města Kumasi v Ghaně



Praktické provedení stanovení koncentrace proteinu

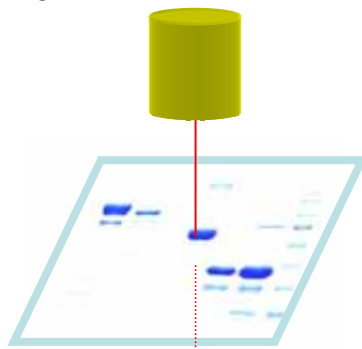
- Připraveny standardy BSA (hovězí sérový albumin nebo Imunoglobulin G) v rozsahu 0.125...1.5 mg/ml
- Po přidání roztoku Coomasiie (např. 980 μ l + 20 μ l roztoku proteinu) a krátké inkubaci (5 min) se měří Abs při 595 nm
- Na základě kalibrační křivky se stanoví koncentrace vzorku
- Nejpřesnější stanovení v oblasti 0.2 – 0.7 mg/ml



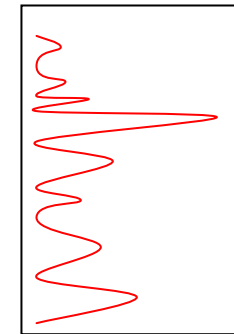
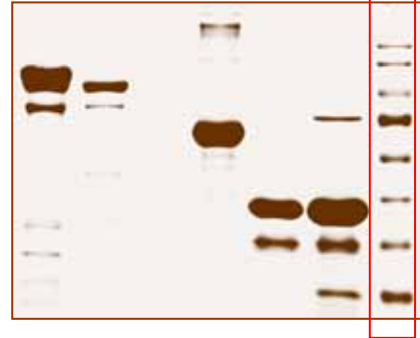
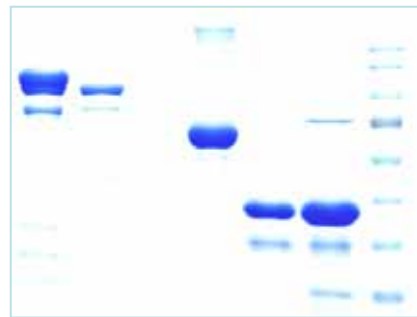
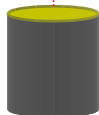
Absorpční densitometrie gelů

- Při analýze molekul v gelu je možno získat současně informace o kvalitě i kvantitě
- Měří se množství absorbovaného světla v závislosti na 2D poloze
- Stanovení koncentrace DNA a proteinu po barvení gelu Coomasie nebo stříbrem

Zdroj světla



Detektor



Optická hustota
(Abs)

21

Výpočet extinkčního koeficientu proteinu

$$\varepsilon_{\text{Celk}} = \text{počet}(\text{Tyr}) \cdot \varepsilon_{\text{Tyr}} + \text{počet}(\text{Trp}) \cdot \varepsilon_{\text{Trp}} + \text{počet}(\text{Cystein}) \cdot \varepsilon_{\text{Cystein}}$$

- Extinkční koeficienty pro proteiny měřené ve vodě při 280 nm:

$$\varepsilon_{\text{Tyr}} = 1490, \varepsilon_{\text{Trp}} = 5500, \varepsilon_{\text{Cystein}} = 125$$

<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>

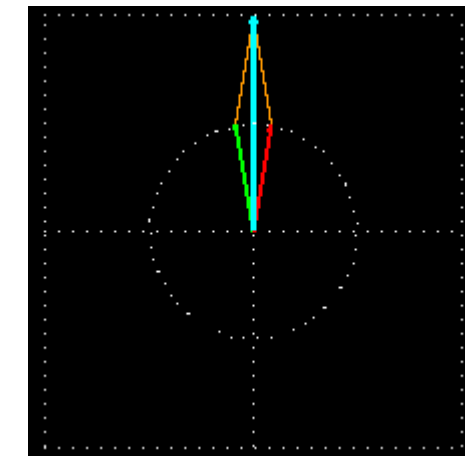
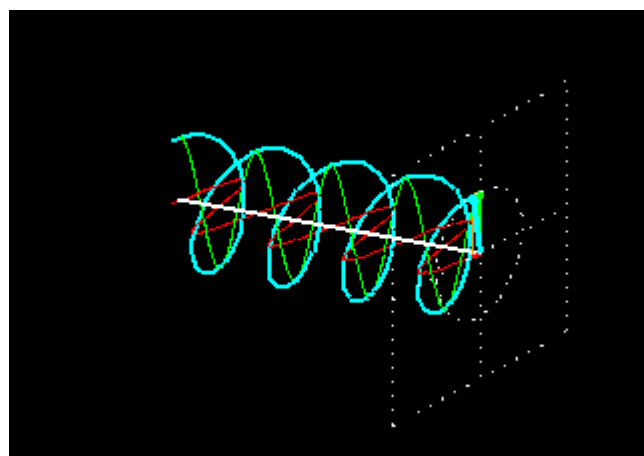
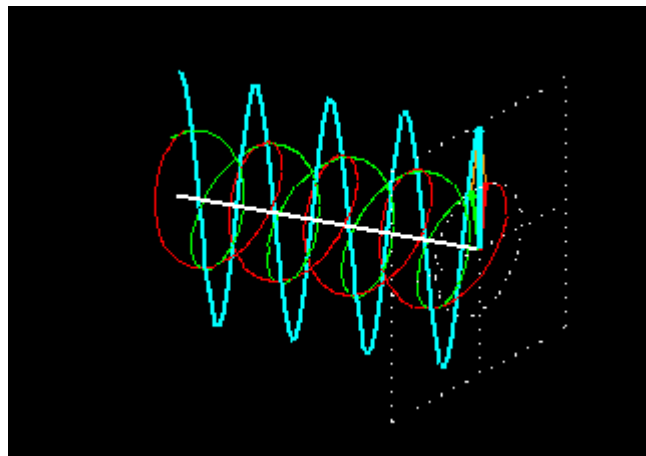
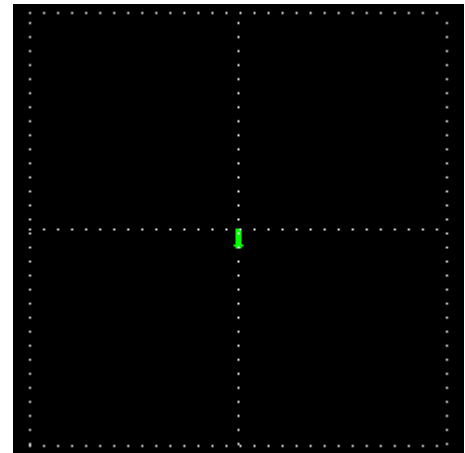
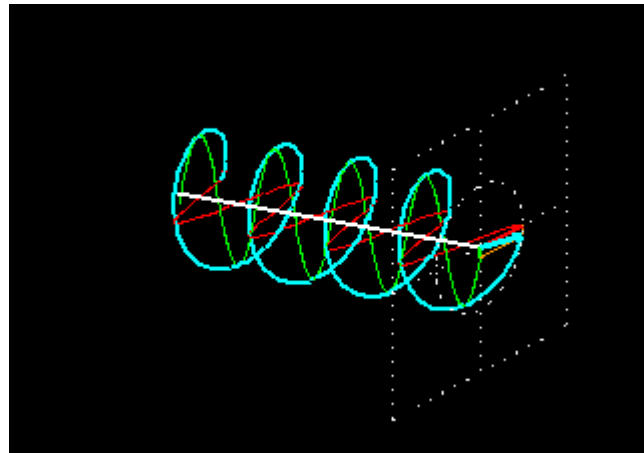
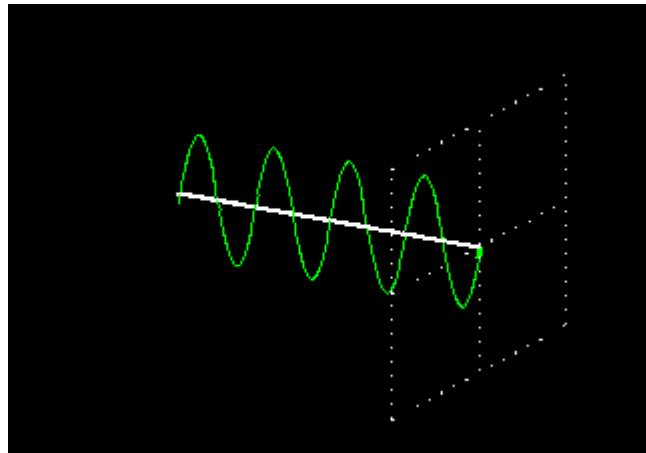
Cirkulární dichroismus ve strukturní analýze molekul

- Cirkulární dichroismus je způsoben asymetrií molekulárních struktur.
- Součástí biologických molekul jsou opticky aktivní molekuly cukrů a aminokyseliny
- V případě uspořádání monomerních jednotek do šroubovice dochází k výraznému zesílení optické aktivity celé makromolekuly
- Optická aktivita roztoků biologických molekul je použita k popisu jejich struktury a zejména strukturních změn

Princip CD

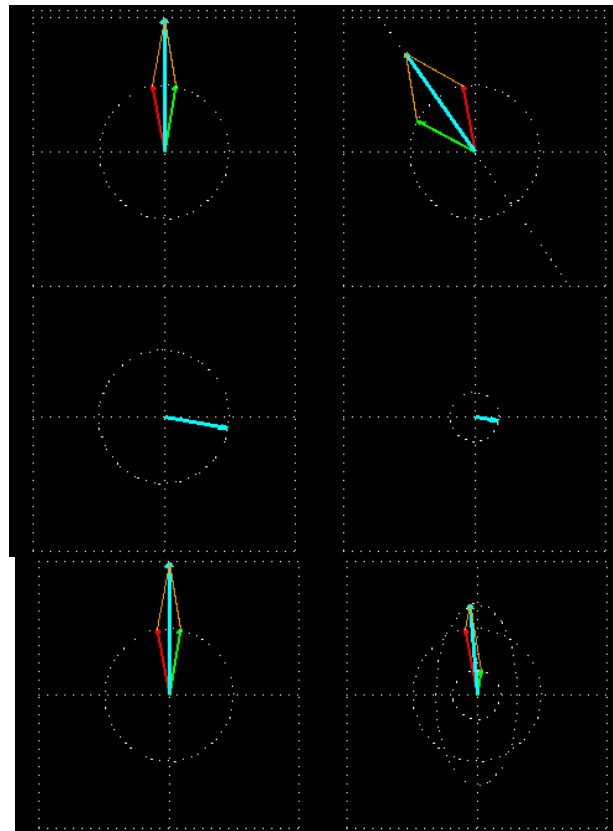
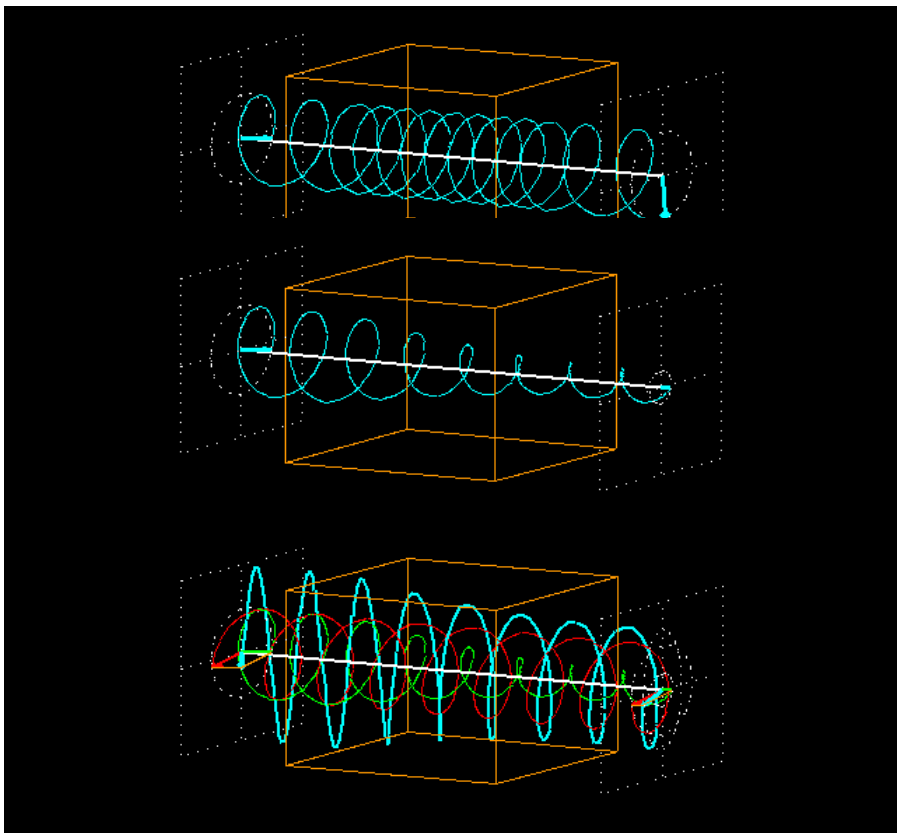
- Látka je **opticky aktivní**, jestliže stáčí rovinu polarizovaného světla
- Rovinně polarizované světlo si můžeme rozložit na levotočivou a pravotočivou složku kruhově polarizovaného světla.
- Levotočivá složka kruhově polarizovaného světla prochází prostředím jinou rychlostí (má jiný index lomu n) než pravotočivá je složka kruhově polarizovaného světla => dojde ke **stočení roviny polarizovaného světla**
- Levotočivá složka kruhově polarizovaného světla je absorbována jinak než pravotočivá složka kruhově polarizovaného světla => dojde ke změně z rovinně polarizovaného světla na **elipticky polarizované**
- **Cirkulární dichroismus** je definován jako rozdíl extinkčního koeficientu pro levo- a pravo-točivou složku kruhově polar. světla $CD = \Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_P$
- často se měří **elipticita** θ – ve stupních
- **Stočení roviny polarizovaného světla a charakterizace elipticky polarizovaného světla dává informaci o struktuře molekul v roztoku**

Rozklad rovinně polarizovaného světla na kruhově polarizované složky



Změna polarizace v asymetrickém prostředí

- V prostředí, kde se levotočivě kruhově pol. světlo pohybuje jinak než pravotočivě, dochází ke změně vzájemného posunu kruhově polarizovaných složek, což způsobí **stočení roviny** polarizace.
- V případě že se liší také absorpce levo- a pravo- kruh. pol. světla vzniká **elipticky polarizované světlo**

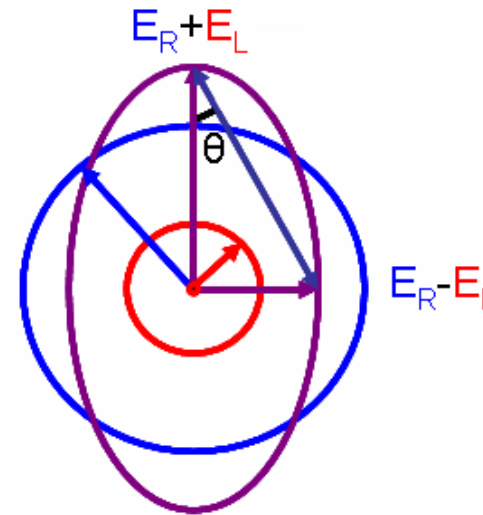


Elipticita

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L}$$

$$\theta = \frac{2.303}{4} (\varepsilon_L - \varepsilon_P) \cdot \frac{180}{\pi} [^\circ]$$

$$\theta = 3.298 \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_P)$$



E_R vektor elektr.
Intenzity pravotočivě
pol. složky

E_L vektor elektr.
Intenzity levotočivě
pol. složky

Elipticita je úhel, který charakterizuje míru změny rovinně polarizovaného světla na elipticky polarizované.

Jestliže je světlo rovinně polarizováno $\theta = 0$

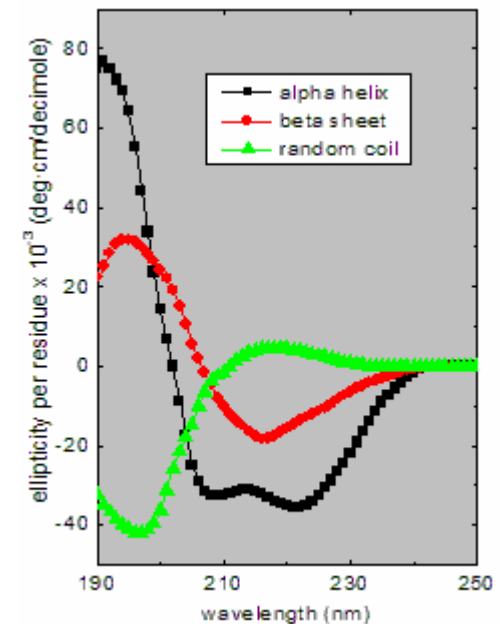
Jestliže je světlo kruhově polarizováno $\theta = 45^\circ$

Princip CD

- Látka je **opticky aktivní**, jestliže stáčí rovinu polarizovaného světla
- Rovinně polarizované světlo si můžeme rozložit na levotočivou a pravotočivou složku kruhově polarizovaného světla.
- Levotočivá složka kruhově polarizovaného světla prochází prostředím jinou rychlostí (má jiný index lomu n) než pravotočivá je složka kruhově polarizovaného světla => dojde ke **stočení roviny polarizovaného světla**
- Levotočivá složka kruhově polarizovaného světla je absorbována jinak než pravotočivá složka kruhově polarizovaného světla => dojde ke změně z rovinně polarizovaného světla na **elipticky polarizované**
- **Cirkulární dichroismus** je definován jako rozdíl extinkčního koeficientu pro levo- a pravo-točivou složku kruhově polar. světla $CD = \Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_P$
- často se měří **elipticita** θ – ve stupních
- **Stočení roviny polarizovaného světla a charakterizace elipticky polarizovaného světla dává informaci o struktuře molekul v roztoku**

Využití CD spektroskopie

- Určování sekundární struktury biomakromolekul
- Stanovení poměrného zastoupení jednotlivých konformací (α šroubovice, β list u proteinů)
- Sledování již nepatrných strukturních změn
- Strukturní přechody DNA (A,B,Z) a proteinů
- Určování teplotní stability
- Sledování interakce protein – protein, protein-DNA
- Sledování terciální struktury proteinů



CD spektroskopie DNA

<http://www.ibp.cz/labs/CD-SNA/index.htm>

Vorlíčková, M., Kypr, J. and Sklenář, V.: NUCLEIC ACIDS: (c) SPECTROSCOPIC METHODS, Encyklopedia of Analytical Science, vol. 6, sec. ed., *Elsevier*, Oxford, (2005) 391-399