

# 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  $\epsilon$ , který má jednotku  $[M^{-1}cm^{-1}]$  pro molární koncentraci nebo  $[mL \cdot mg^{-1}cm^{-1}]$  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  $320 \mu g/mL = 1 mM$ .

## Materiál

- DNA (Salmon sperm; přibližná koncentrace = 7,2 mg/mL)
- Oligonukleotid CNF2\_Bot (5' GTTATCCTTTGAGGGTTTAG; přibližná koncentrace = 0,02 mg/mL)
- TE pufr
- 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.
5. Nařed'te 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 přístroje Hach Lange DR6000:**  
 -  -  - nastavit hodnoty min a max λ -  -  -
8. Na základě zadané sekvence oligonukleotidu stanovte extinkční koeficient  $\epsilon_{260}$  a spektroskopicky určete jeho koncentraci. Potřebné parametry lze získat na stránce <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
9. Změřte spektrum značeného oligonukleotidu ve stejném rozsahu vlnových délek a porovnejte jej se spektrem neznačeného oligonukleotidu.

## Komentář cvičitele Pavla:

Se spektrofotometrem jste se již všichni někdy setkali... Malé opakování: Kyvetu je dobré vkládat do spektrofotometru stále ve stejné orientaci – z jiné strany je jinak poškrábaná, a to může ovlivňovat měření. Pro správné měření absorbance je dobré být v rozsahu  $A = \langle 0,2; 0,8 \rangle$ . Pokud budeme vzorek ředit, je vhodné se pohybovat kolem hodnoty  $A = 0,5$ . Důležité jsou absorpční maxima pro jednotlivé vlnové délky: 220 nm = anorganické kontaminace, 260 nm = DNA, 280 nm = proteiny.

-> Bude nutné ředit rozmraženou jednovláknovou DNA „CNF2\_Bot“? Jaká je její skutečná koncentrace [mg/mL]?

V zadání máme sekvenci a přibližnou koncentraci = 0,02 mg/mL.

Výstup z OligoAnalyzeru (dostupné z webu):

SEQUENCE	5'- GTT ATC CTT TGA GGG TTT AG -3'
COMPLEMENT	5'- CTA AAC CCT CAA AGG ATA AC -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	40 %
MELT TEMP	47.9 °C
MOLECULAR WEIGHT	6169 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	191700 L/(mole·cm)

Kde nás zajímá molekulová hmotnost a extinkční koeficient.

Vycházíme ze základních vzorců:

$$A_{\text{optimalni}} \approx 0,5 \quad n = \frac{m}{V} \quad c_m = \frac{m}{V} \quad c = \frac{n}{V} \quad A = \varepsilon \times c$$

Po dosazení získáváme:

$$c = \frac{c_m}{M} = \frac{0,02[\text{mg/ml}]}{6169[\text{g/mol}]} = 3,2\mu\text{M} \quad A = c \times \varepsilon = 3,2 \times 10^{-6} \times 191700 = 0,61$$

Z čehož je patrné, že naše vypočítaná teoretická hodnota absorbance leží v lineární oblasti absorbance  $\langle 0,2; 0,8 \rangle$ . Ze spektrofotometru následně odečítáme hodnotu  $A_{260} = 0,565$ . Zpětným výpočtem získáváme:

$$c = \frac{A}{\varepsilon} = \frac{0,565}{191700} = 2,95 \cdot 10^{-6} \text{ M} = 2,95\mu\text{M} \quad c_m = c \times M = 2,95 \cdot 10^{-6} \times 6169 = 0,018 \text{ g/l} = 0,018 \text{ mg/ml}$$

Když porovnáme přibližnou koncentraci 0,02 mg/mL se získanou hodnotou 0,018 mg/mL, vidíme, že je vzorek méně koncentrovaný než před zamražením.

-> Druhá praktická část se týká měření dvouvláknové genomové DNA „Salmon sperm“; přibližná koncentrace = 7,2 mg/mL.

U dvouvláknové DNA se využívá aproximace:  $A = 1$  je dosažena u koncentrace DNA  $c = 50 \mu\text{g/mL}$  – z tohoto budeme vycházet. Bude potřeba vzorek ředit? Pokud ano, kolikrát (abychom byli kolem hodnoty  $A=0,5$ ) + zaokrouhleme ředění na stovky. Jaká je skutečná koncentrace vzorku?

Ze zadání:  $c=7,2 \text{ mg/mL} = 7200 \mu\text{g/mL}$  (abychom měli hodnoty koncentrace ve stejných jednotkách)

$$\begin{array}{|l} \uparrow A=1 \dots\dots\dots c=50 \mu\text{g/mL} \uparrow \\ | x \dots\dots\dots 7200 \mu\text{g/mL} | \end{array} \quad \frac{x}{1} = \frac{7200}{50} \quad x = 144 \dots \text{ pro } A = 1,0$$

pro  $A=0,5$ :  $\frac{144}{0,5} = 288x$  ředit -> budeme 300x ředit.

Kolik dáme čeho, když chceme 300x ředit do celkového objemu 1,0 mL?

$$\frac{1000 \mu\text{L}}{300x \text{ ředit}} = 3,33 \mu\text{L} \quad \text{Smícháme } 966,6 \mu\text{L TE pufru a } 3,33 \mu\text{L zásobní DNA.}$$

Spektrofotometr nám ukázal hodnotu  $A_{260} = 0,504$ .

Jaká je skutečná koncentrace vzorku [ $\mu\text{g/mL}$ ]?

Musíme zohlednit ředění, které jsme použili:  $A_{\text{skutečná}} = 300 \times 0,504 = 151,2$ .

Opět použijeme trojčlenku a nezapomene převést na správné jednotky:

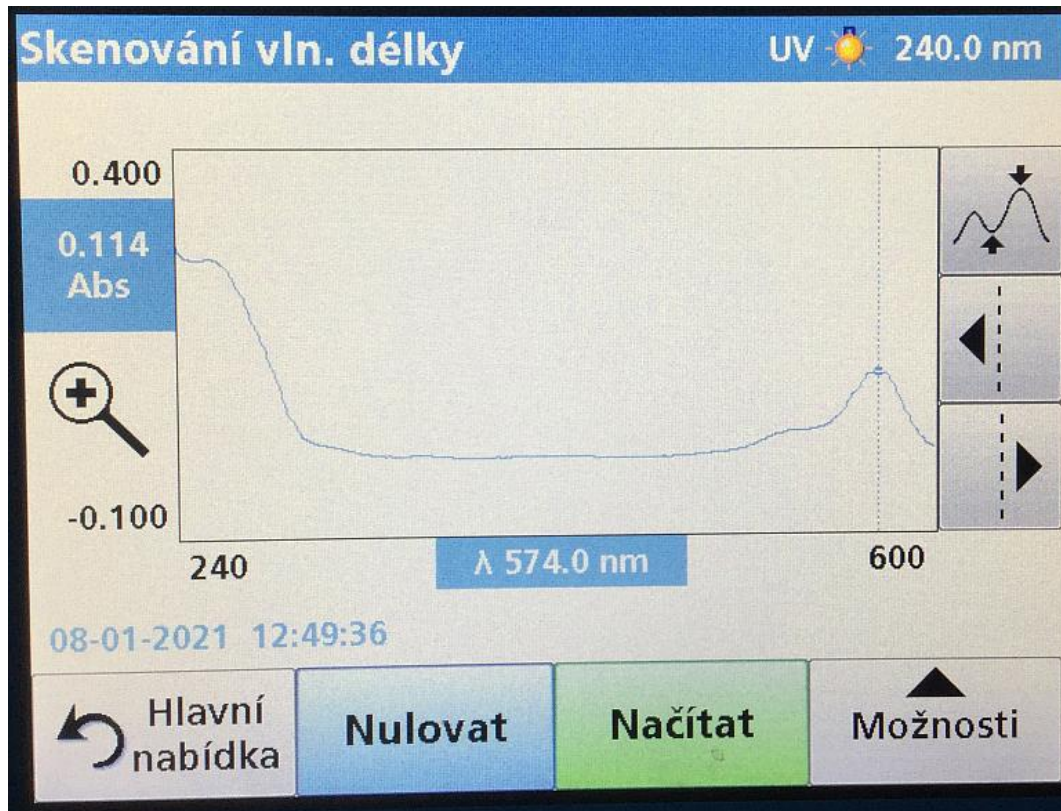
$$\begin{array}{|l} A=1 \dots\dots\dots c=50 \mu\text{g/mL} \\ 151,2 \dots\dots\dots x \mu\text{g/mL} \end{array} \quad \frac{151,2}{1} = \frac{x}{50} \quad x = 7560 \mu\text{g/mL} = 7,56 \text{ mg/mL}$$

Dle výsledku  $c = 7,56 \text{ mg/mL}$  usuzujeme, že vzorek byl o něco málo koncentrovanější, než jsme očekávali.

-> Třetí a poslední praktická úloha se týká změření neznámého vzorku DNA, lehce narůžovělé barvy, který byl skladován ve zkumavce obalené alobalem.

Otázka: Co je na tomto vzorku zvláštní?

Změříme absorpční spektrum v závislosti na vlnové délce:



Vidíme maximum kolem 260 nm – což je bezpochyby naše DNA. Také vidíme druhé významné maximum v 574 nm – co by to mohlo být?

Je to nějaký neznámý fluorofor – a podle tvaru křivky jsme dokonce schopni dokonce určit, jaký... (je to Rhodamin Red).

Otázka: Záznam spektra absorpance v oblasti pro fluorofor odpovídá jaké křivce (excitační/emisní)? A proč?

Nejdříve se zamysleme nad tím, co spektrofotometr měří – měří absorbanci. A co to vlastně ta absorbance je, myslím z pohledu energie? Energie se nám ztrácí v kyvetě, když ji vzorek pohlcuje – což je vyhodnoceno skrze úbytek intenzity záření a následně absorbance. Fluorofor nám pohlcuje energii, takže pozorujeme excitační spektrum. Emisní spektrum by se měřilo v „L“ uspořádání kyvetového prostoru.