

Absorpční spektroskopie při biologické analýze molekul

Fluorescenční metody ve vědách o životě – cesta od molekuly k buňce
C7230

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních **Biomolekul**

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

M U N I
S C I

Národní centrum
pro výzkum
biomolekul





Stanovení koncentrace DNA



Určení koncentrace proteinů



Cirkulární dichroismus při stanovení struktury biomolekul



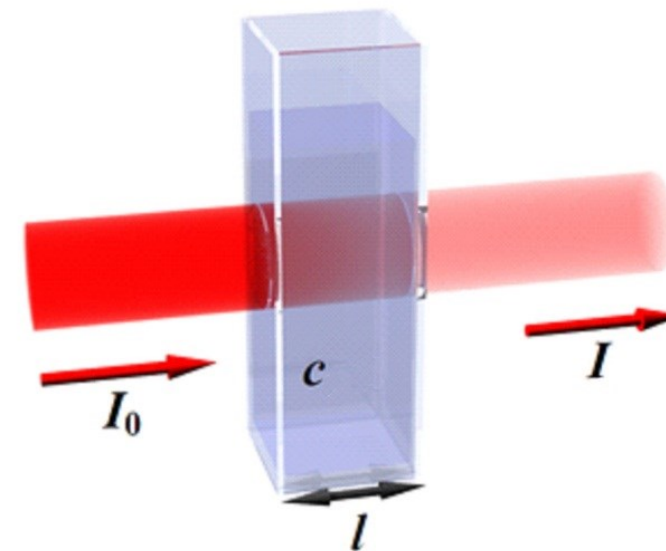
Jak funguje sledování 3D filmů

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:**

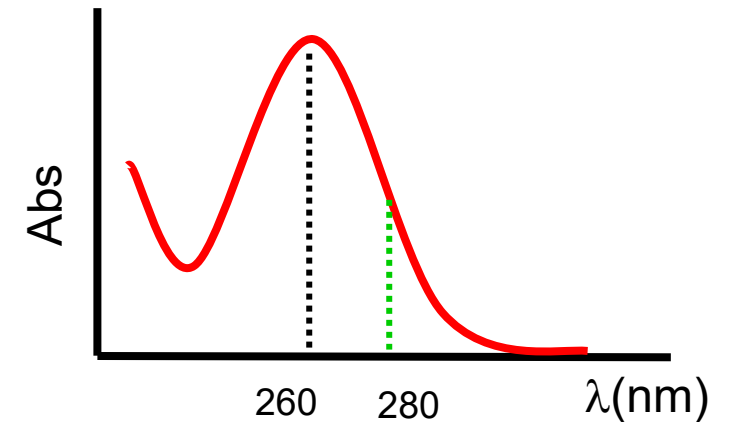
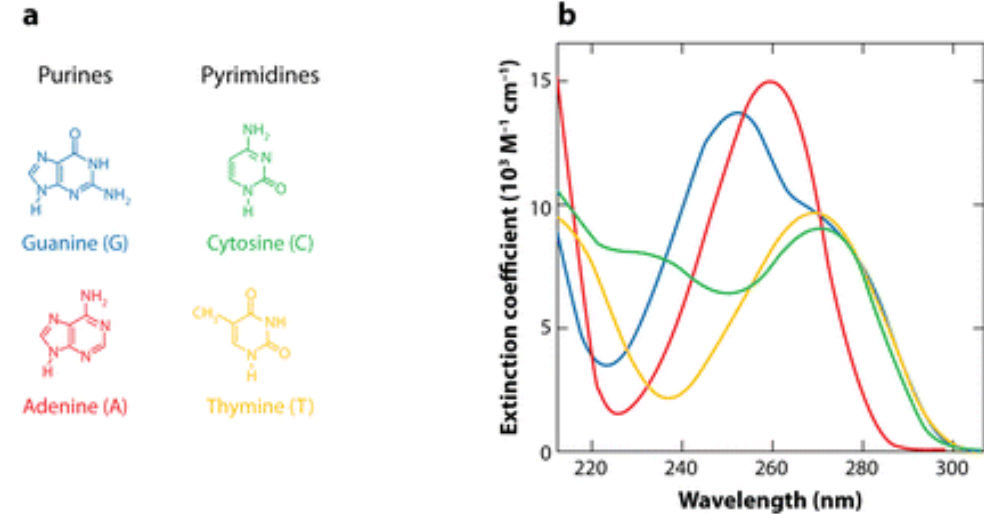
Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

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

ε =molární extinční koeficient látky, c -koncentrace, l -délka optické dráhy

Absorpční spektrum DNA

- Spektrum DNA je tvořeno příspěvkem 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!**

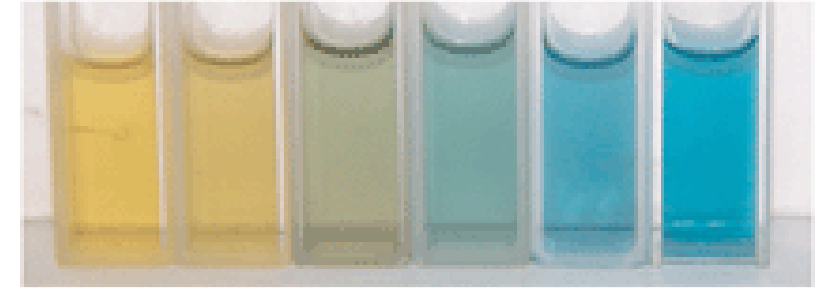
Určování extinkčního koeficientu oligonukleotidů

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

- **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, které ovlivňují výrazně ϵ
- Využívá kolorimetrie – stupeň zbarvení roztoku je přímo úměrný množství PO_4 tj. množství DNA (ang. Ammonium molybdate test)



Murphy, J.H. and Trapane, T.L., 1996, Analytical Biochemistry, 240, 273-282.

Výpočet extinkčního koeficientu DNA

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

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

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

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

Warshaw, M.M. and Tinoco, I. (1966) Optical properties of sixteen dinucleoside phosphates. *J. Mol., Biol.*, 20: 29-38.

Cantor, C.R. and Warshaw, M.M. (1970) Oligonucleotide interactions. *Biopolymers*, 9:1059-1103 Fluorescenční metody | C7230 | Ctírad Hofr – LifeB | FGP | NCBR

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

OligoAnalyzer™ Tool

<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

Oligonucleotide Properties Calculator

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

Jak určit koncentraci z optické hustoty?



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 Abs 0...1 platí přibližně lineární vztah mezi koncentrací biologického materiálu a hodnotou absorbance.

Příklad výpočtu koncentrace DNA

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

Celkem po syntéze 8,5 OD₂₆₀

Přidáme 500 μl H₂O

Jaká je molární koncentrace DNA?

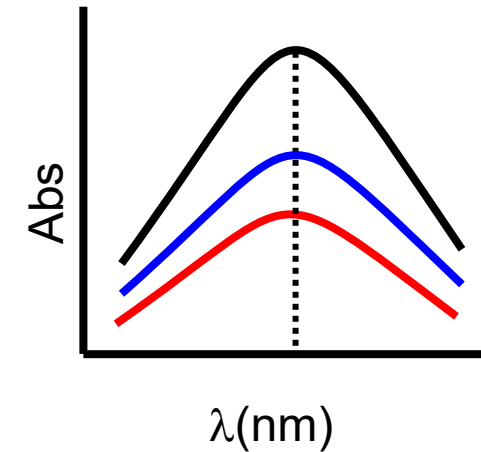
$$c = 93 \mu\text{M}$$

Molární koncentrace celých řetězců!

Hypochromní efekt při tvorbě DNA

Snižování absorpance :

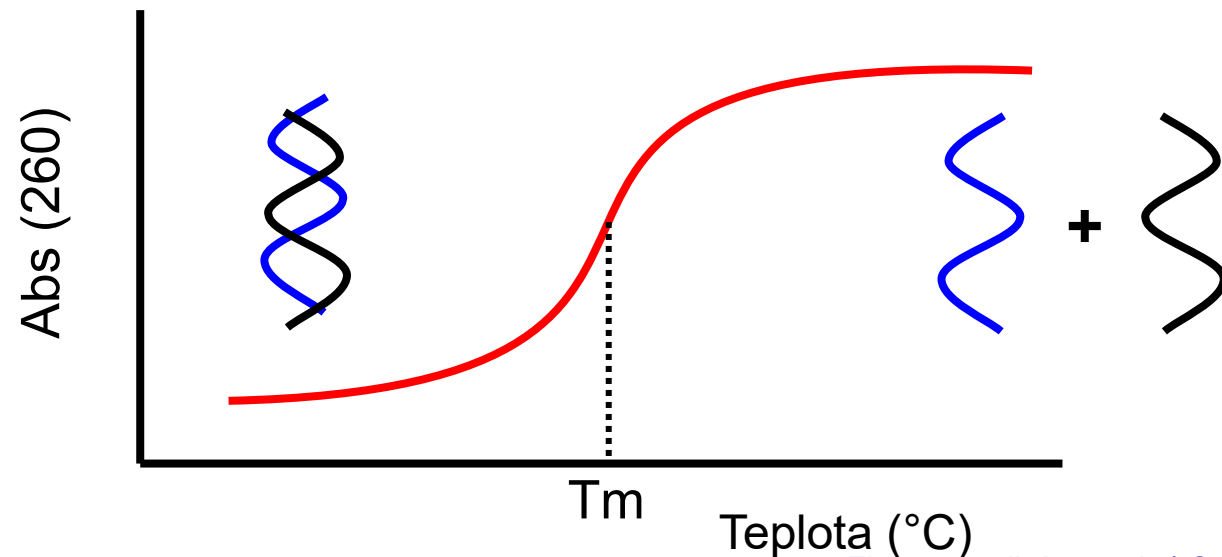
Abs (nukleotidy) > Abs (ssDNA) > Abs (dsDNA)



- 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 absorpance (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

Measurement of protein using bicinchoninic acid

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

Určete jak se změní T_m při zvýšené koncentraci

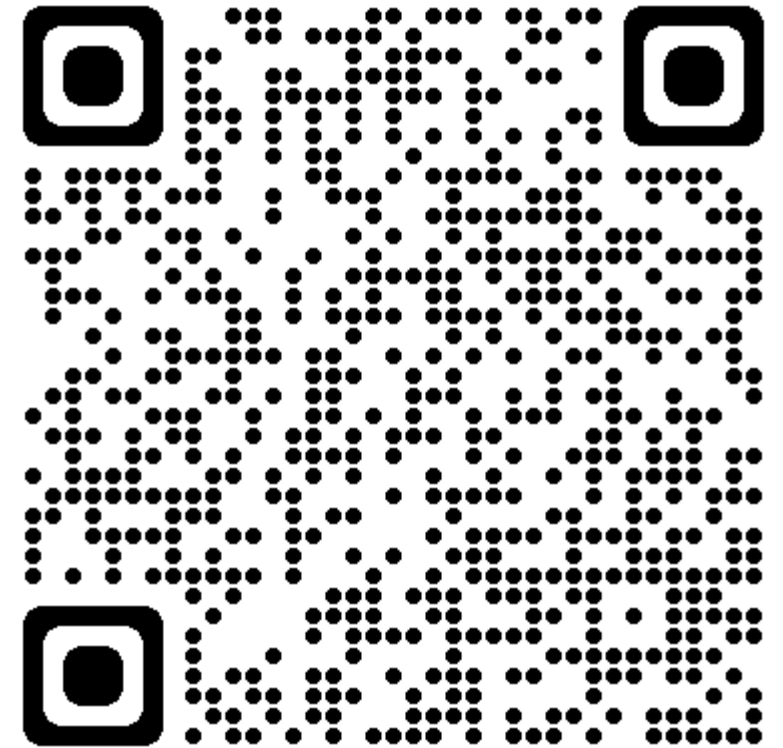
Sekvence TTA GGG CCC TAA
vytváří duplex s komplementárním řetězcem
Určete hodnotu T_m vypočtenou metodou
Nearest Neighbor.

Změna koncentrace **oligonukleotidu**

$c = 50 \text{ nM}, 500 \text{ nM}, 5000 \text{ nM}$

Změna koncentrace **solí**

$c = 50 \text{ mM}, 500 \text{ mM}, 1000 \text{ mM}$



Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

[Nucleotide base codes](#)

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

[5' modification](#) (if any)

[3' modification](#) (if any)

Select molecule

nM Primer

Measured Absorbance at 260 nanometers

mM Salt (Na⁺)

Calculate **Swap Strands** **BLAST** **mfold**

Physical Constants

Length: Molecular Weight: GC content: %

1 ml of a sol'n with an Absorbance of at 260 nm
is microMolar and contains micrograms.

Melting Temperature (T_M) Calculations

°C (Basic)
 °C (Salt Adjusted)
 °C (Nearest Neighbor)

Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK cal/(°K*mol)

deltaH Kcal/mol

deltaG Kcal/mol

deltaS cal/(°K*mol)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

(Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)

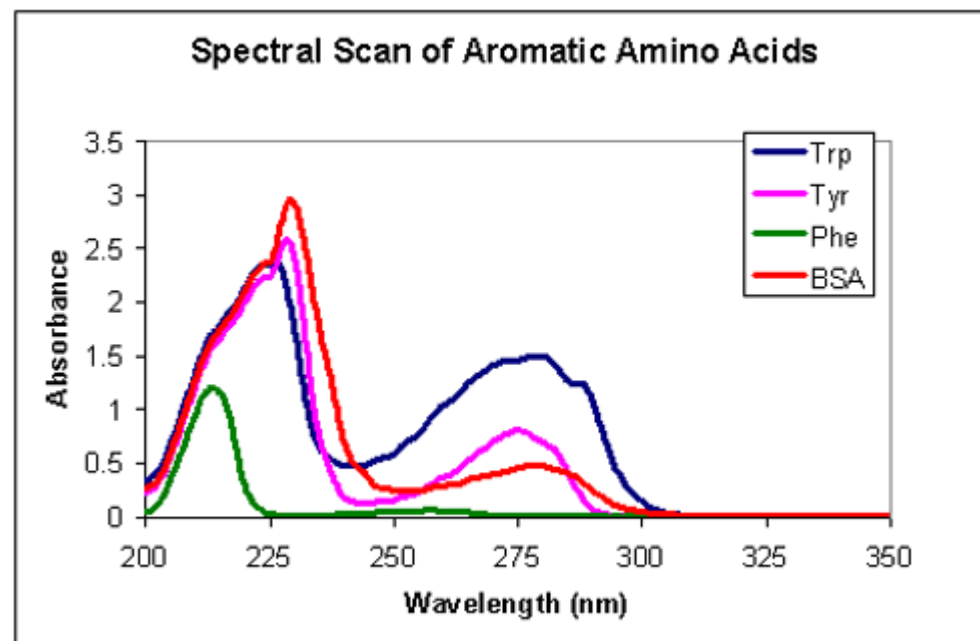
(Minimum base pairs required for a hairpin)

Check Self-Complementarity

Směs proteinů



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

Bradfordova metoda - změna absorpčního maxima v přítomnosti proteinu

Výpočet extinkčního koeficientu
na základě sekvence aminokyselin

Bradfordova 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.
- **Coomassie Brilliant Blue** - váže bazické a aromatické aminokyselinové zbytky v proteinech (arginin (ARG), fenylalanin (PHE), tryptofan (TRY) a prolin (PRO))
- Rozsah použití metody je řádově 0.1 – 1.25 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).

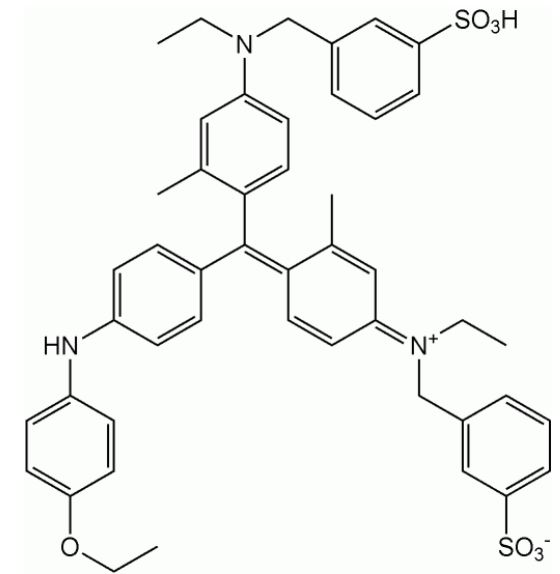
Coomasie

Další názvy:

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

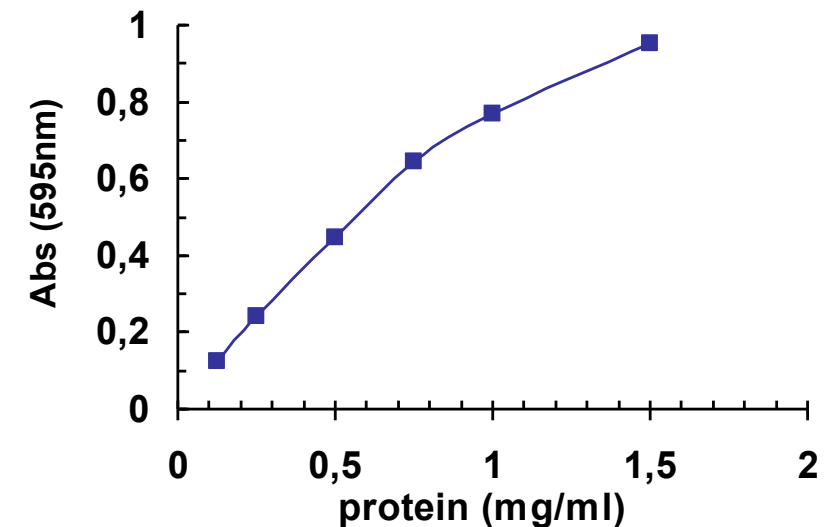
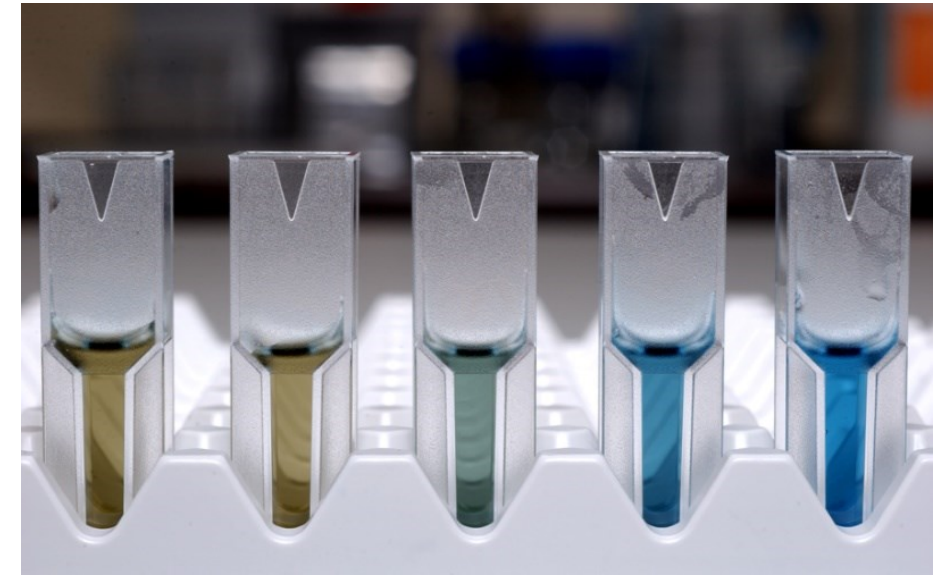
Původně byla tato látka používána v textilním průmyslu k barvení vlny

Jméno podle Afrického města Kumasi v Ghaně



Praktické provedení stanovení koncentrace proteinu

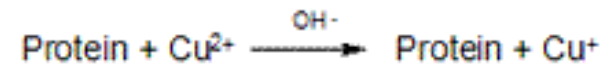
- Připraveny standardy BSA (hovězí sérový albumin nebo Imunoglobulin G) v rozsahu 0.125...1.5 mg/ml
- Po přidání roztoku Coomasie (např. 980 ml + 20 ml roztoku proteinu) a krátké inkubaci (5 min) se měří Abs při 595 nm
- Na základě kalibrační křivky se stanoví koncentrace vzorku
- Nejpřesnější stanovení v oblasti 0.2 – 0.7 mg/ml
- Interference s detergenty
Tween 20 od 0.06%
Triton X100 od 0.125 %



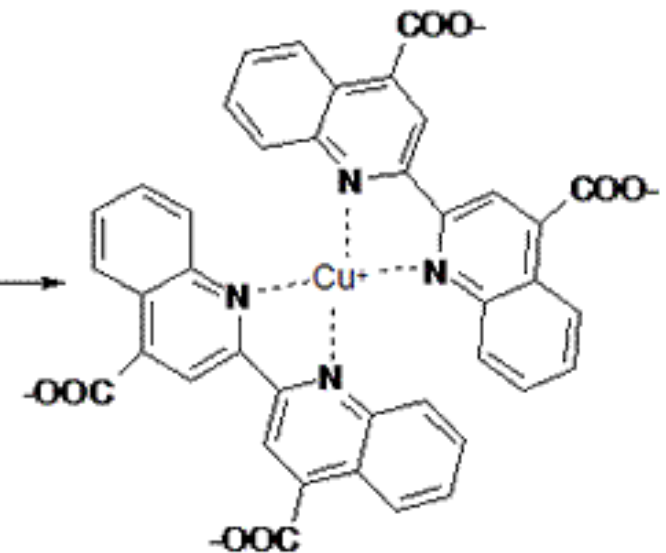
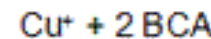
BCA metoda

- BCA = Bicinchoninic acid
- Barevná reakce založena na interakci Cu kationtů s BCA a peptidovou vazbou
- Purpurové zbarvení detekovatelné při 562 nm
- Lineární rozsah 1-30 ug při inkubaci 37°C, 30 min.
- Lépe toleruje detergenty: SDS do 1%
- Redukční činidla ovlivňují výsledky, nutno zajistit jejich stejnou koncentraci v pufru a standardech

Step 1:



Step 2:

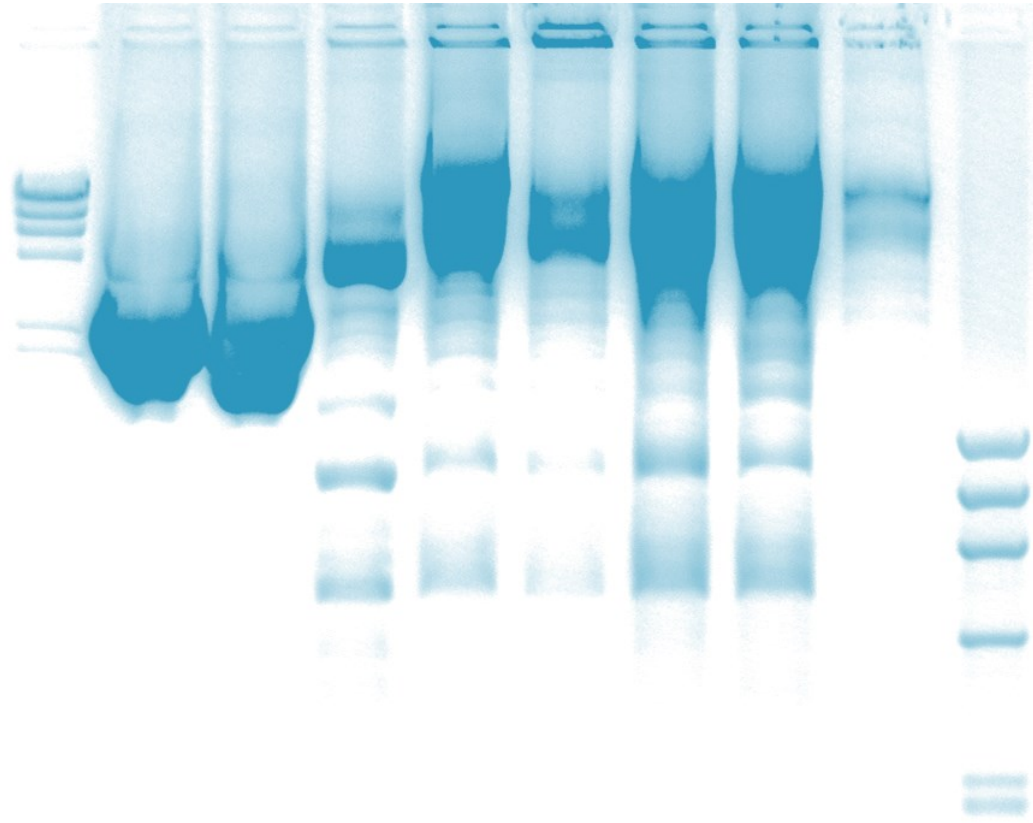


BCA Protein Assay Reagent – bicinchoninic acid



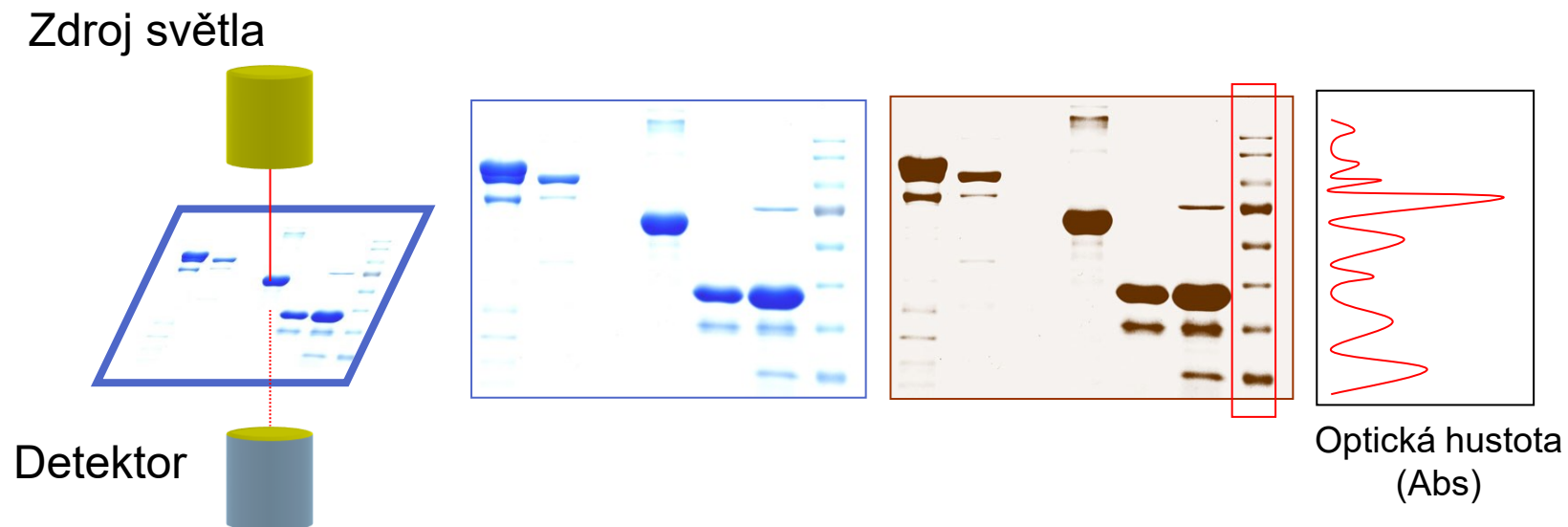
https://youtu.be/xBQXQW_Vfoo?si=-m1Pke-Er_MsEBSu

Kvalitativní analýza proteinů



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



Výpočet extinkčního koeficientu proteinu

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

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

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

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

Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989). Anal. Biochem. 182:319-326(1989).



Bělení prádla I

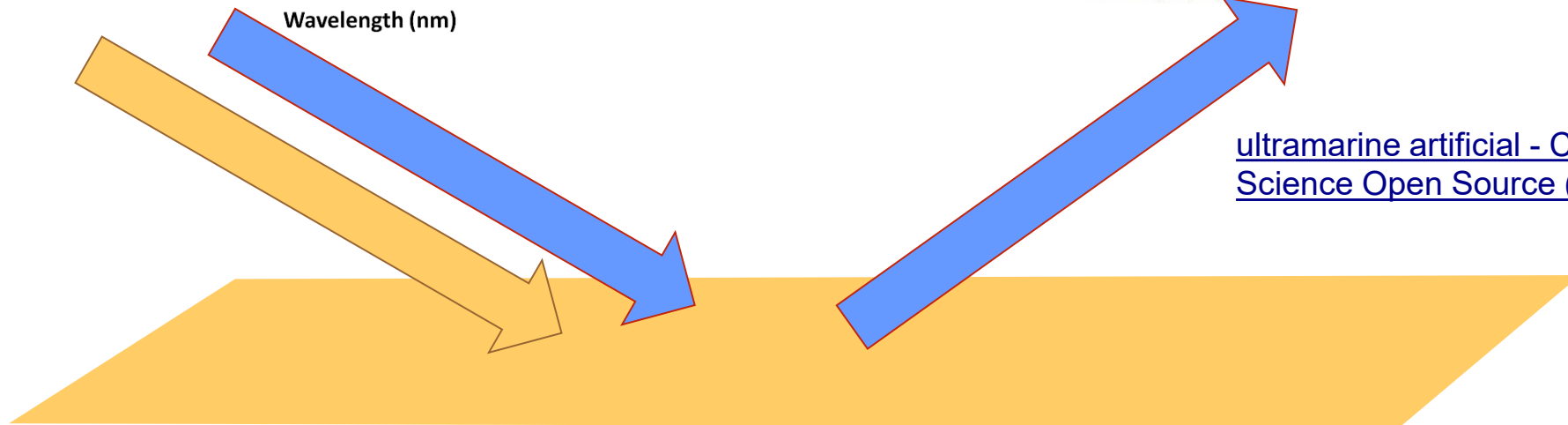
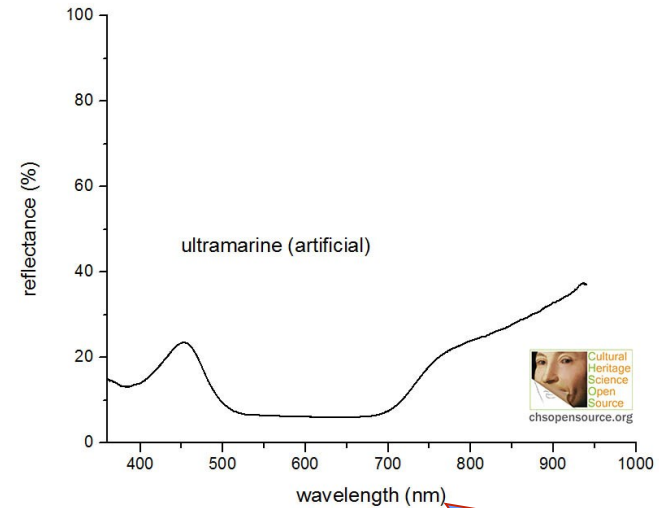
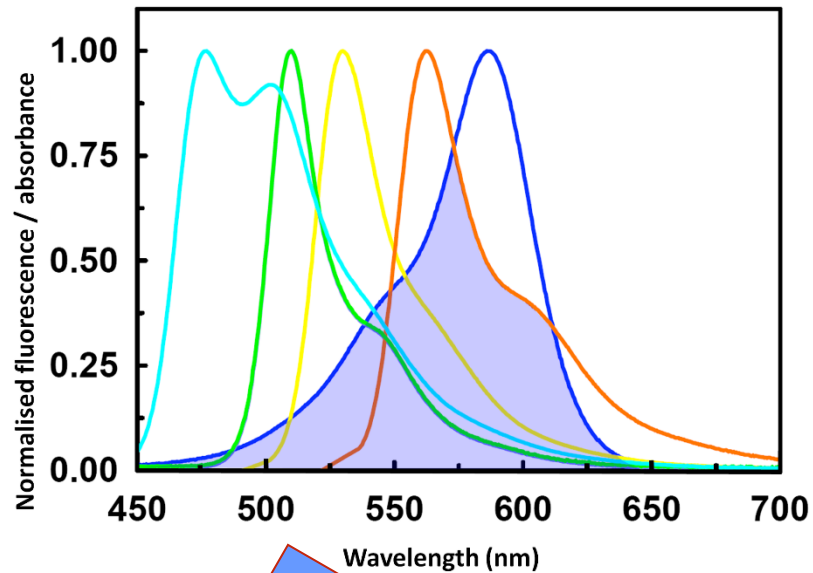


[Ultramarine -
Wikipedia](#)



[Lazurit – Wikipedie \(wikipedia.org\)](#)

Bělení prádla II

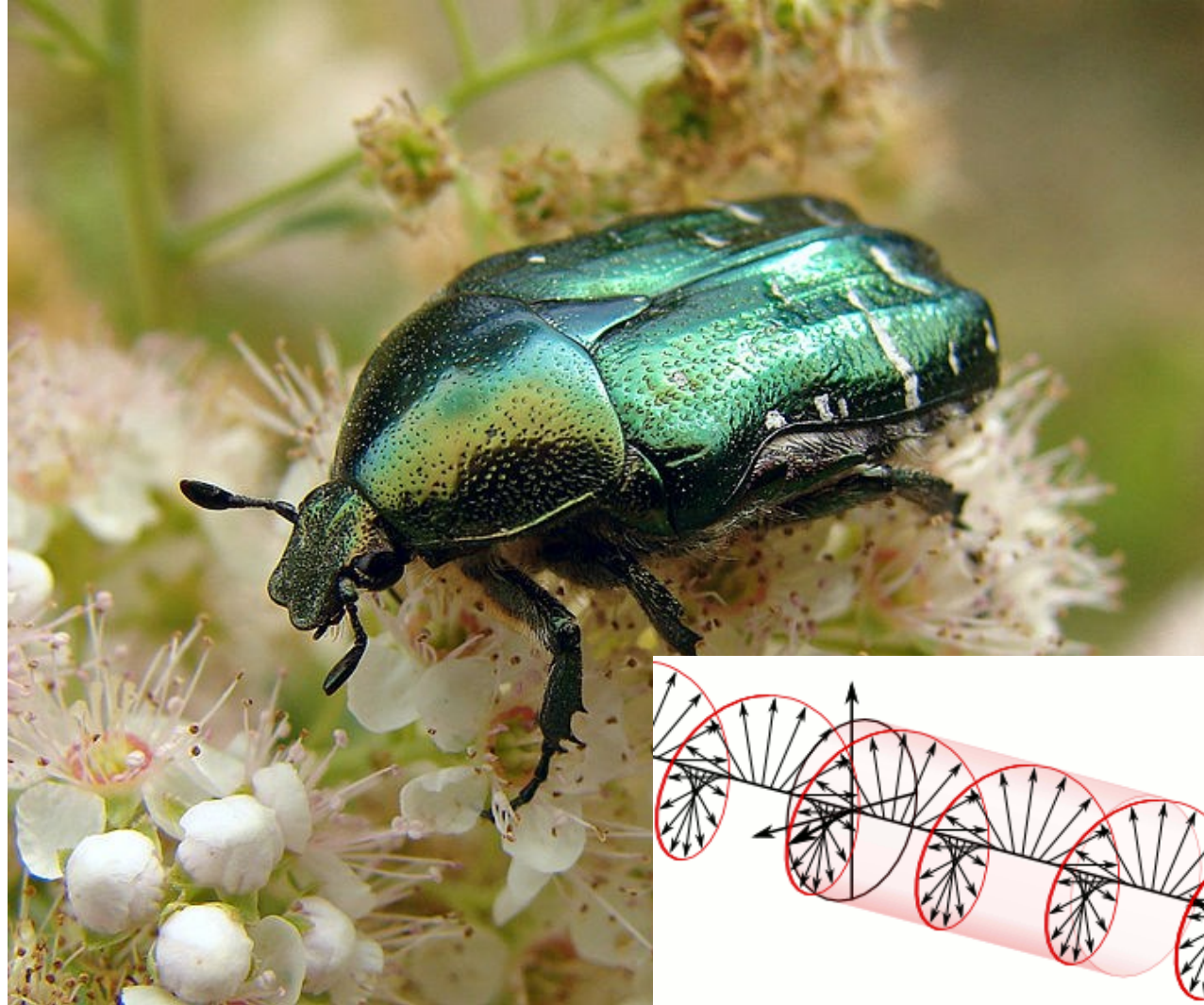


[ultramarine artificial - Cultural Heritage Science Open Source \(chsopensource.org\)](https://www.chsopensource.org/)

[Absorption in the visible region \(video\) | Khan Academy](https://www.khanacademy.com/a/absorption-in-the-visible-region/a/absorption-in-the-visible-region/v/absorption-in-the-visible-region)
<https://youtu.be/5HMMfiyszjo?t=202>

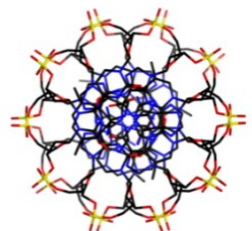
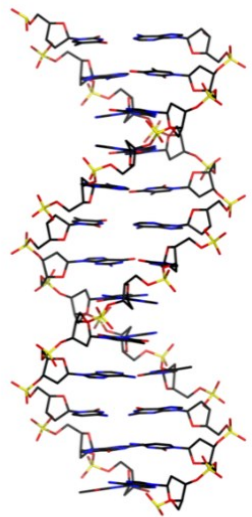
Mrknutí v 3D brýlích před zrcadlem

Cirkulární polarizace



Cirkulární dichroismus ve strukturní analýze molekul

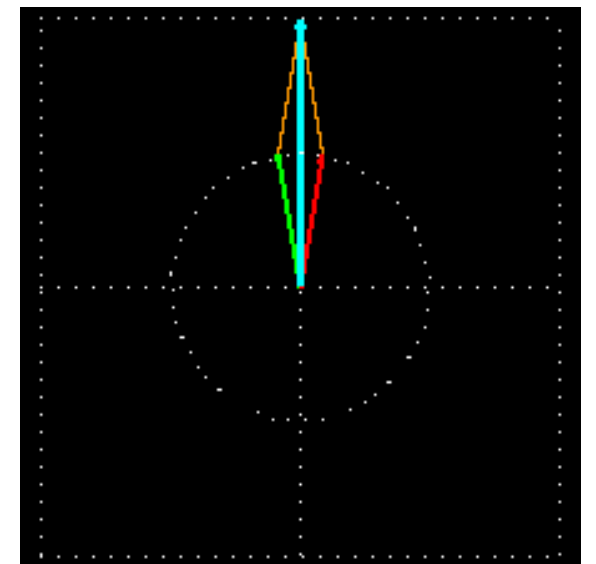
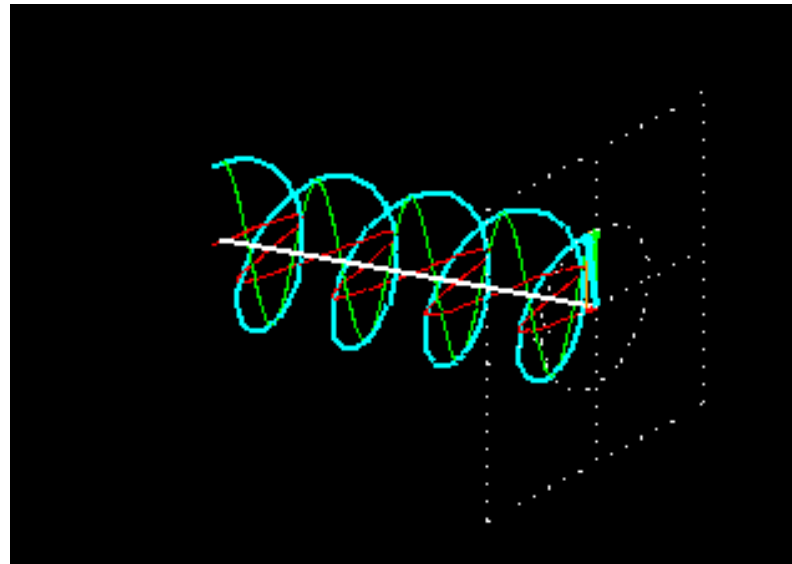
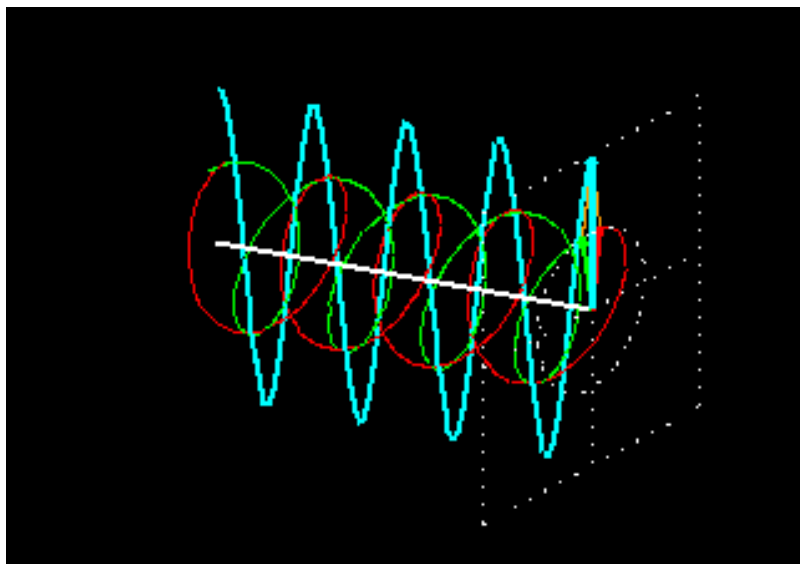
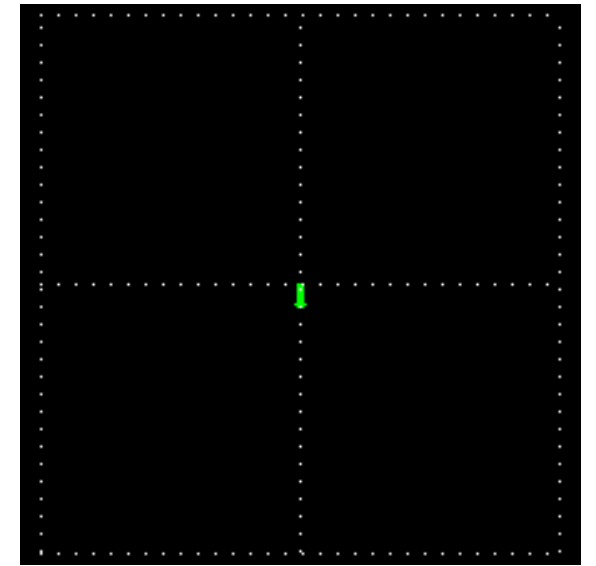
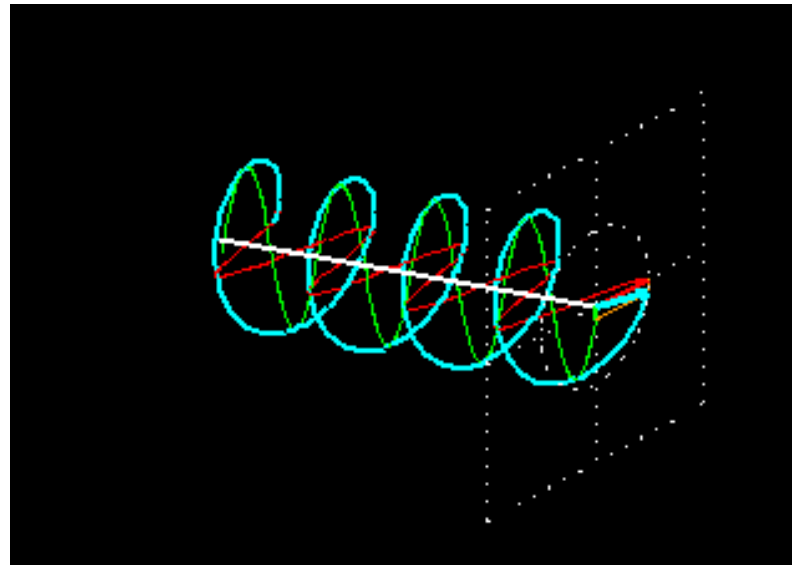
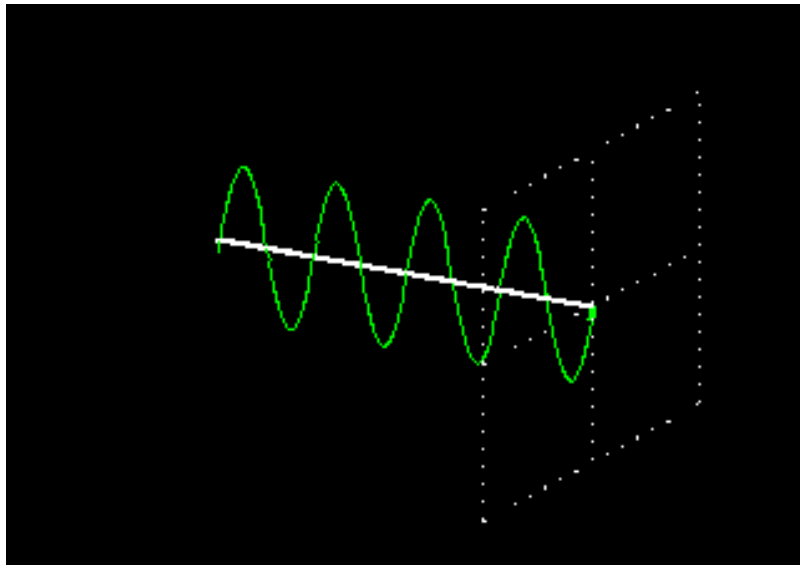
- Cirkulární dichroismus je způsoben asymetrií molekulárních struktur
- Součástí biologických molekul jsou opticky aktivní molekuly cukrů a aminokyseliny
- V případě uspořádání monomerních jednotek do šroubovice dochází k výraznému zesílení optické aktivity celé makromolekuly
- Optická aktivita roztoků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



Princip CD

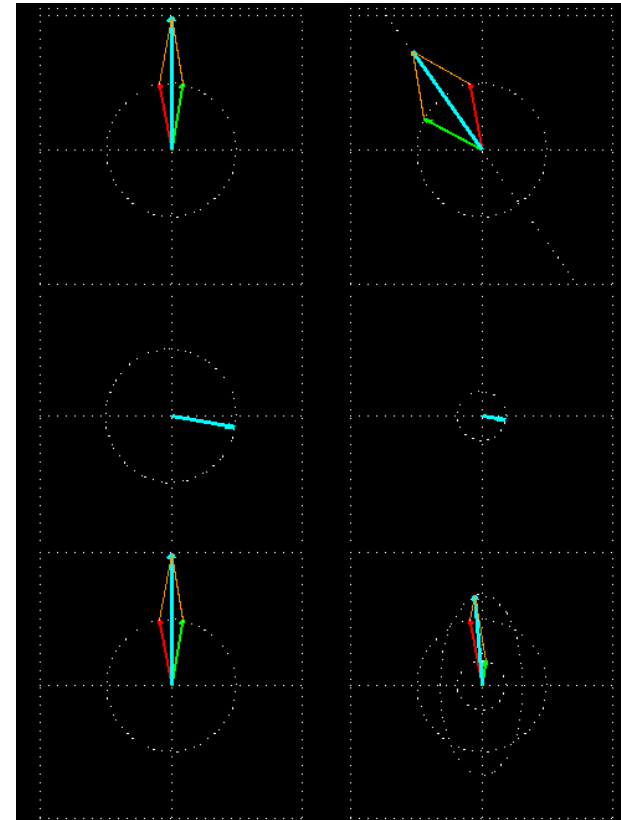
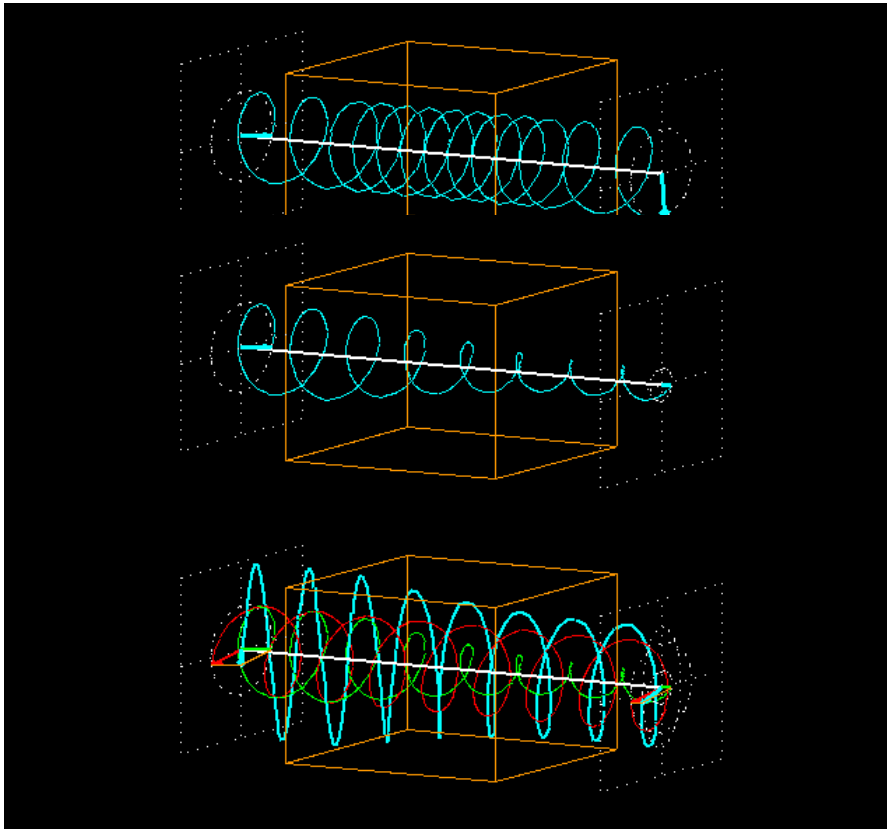
- Látka je **opticky aktivní**, jestliže stáčí rovinu polarizovaného světla
- Rovinně polarizované světlo si můžeme rozložit na levotočivou a pravotočivou složku kruhově polarizovaného světla.
- Jestliže levotočivá složka kruhově polarizovaného světla prochází prostředím jinou rychlostí (má jiný index 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

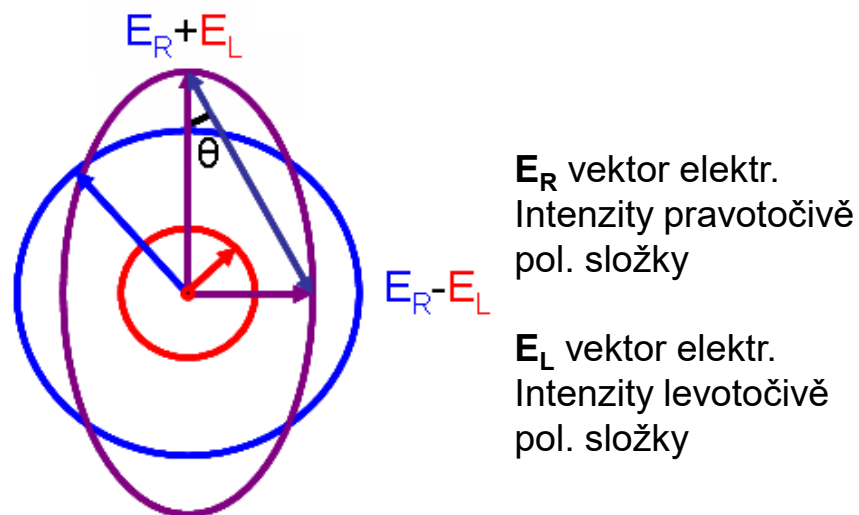


Změna polarizace v asymetrickém prostředí

- 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



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

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

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

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

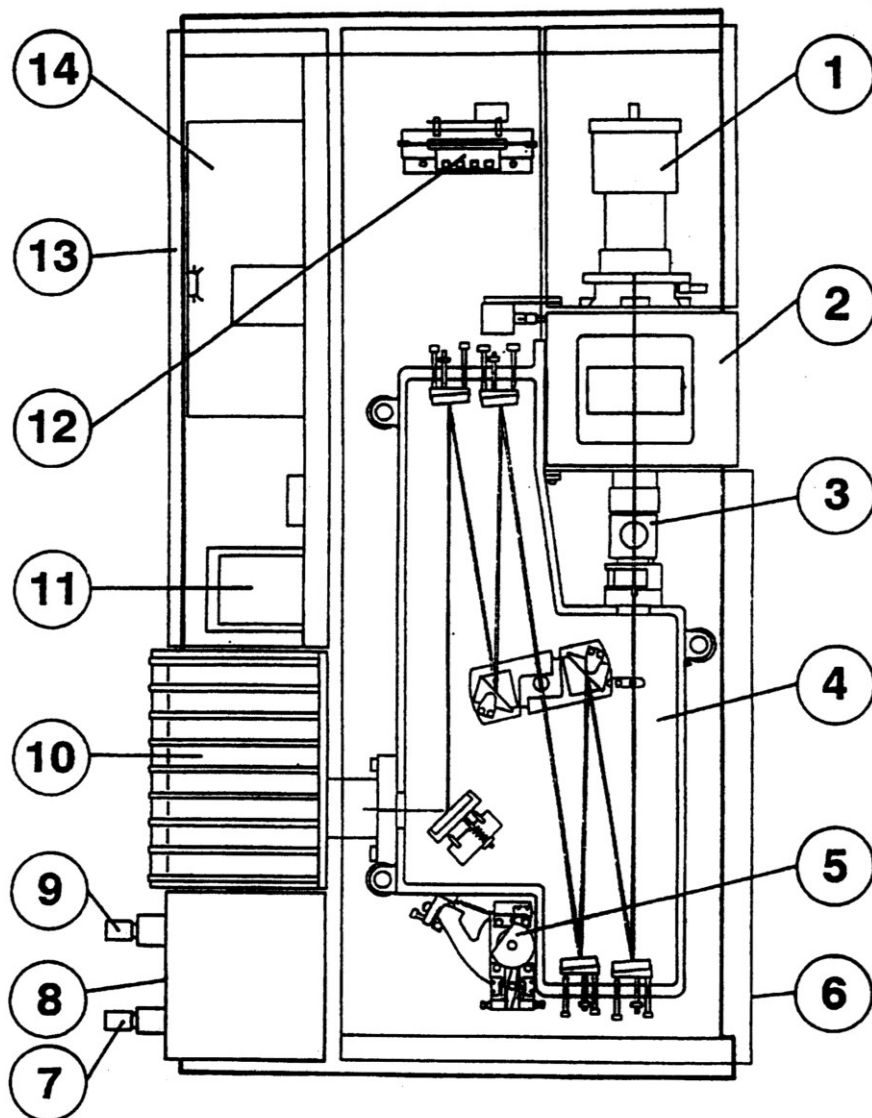
Jestliže je světlo rovinně polarizováno $\theta = 0$

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 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**

Schéma přístroje na měření cirkulárního dichroismu



1. Fotonásobič

2. Kyvetový prostor

3. **Modulátor**

Tekutý krystal, který je piezoelektricky střídavým proudem stlačován a roztahován a tak střídavě moduluje doprava a doleva kruhově polarizovaný paprsek

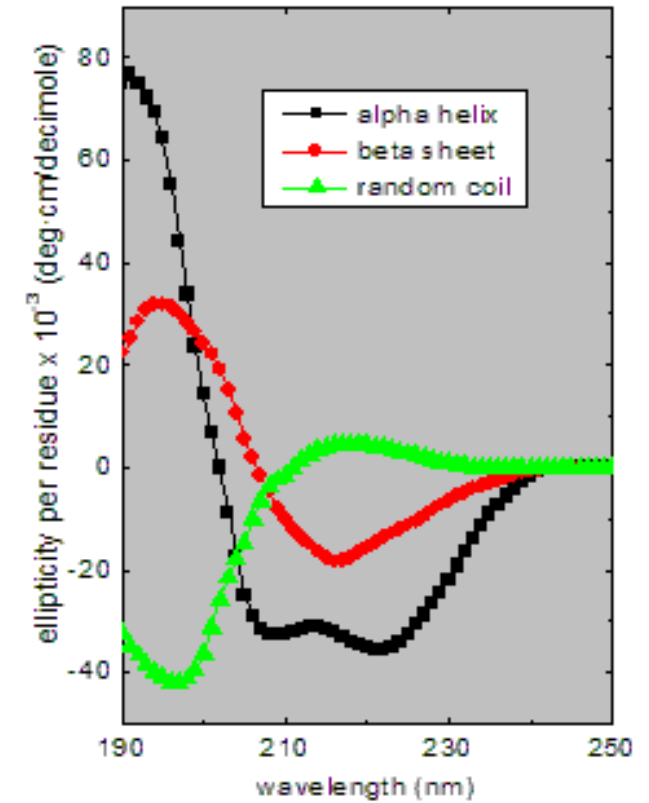
5. Monochromátor

10. Lampa

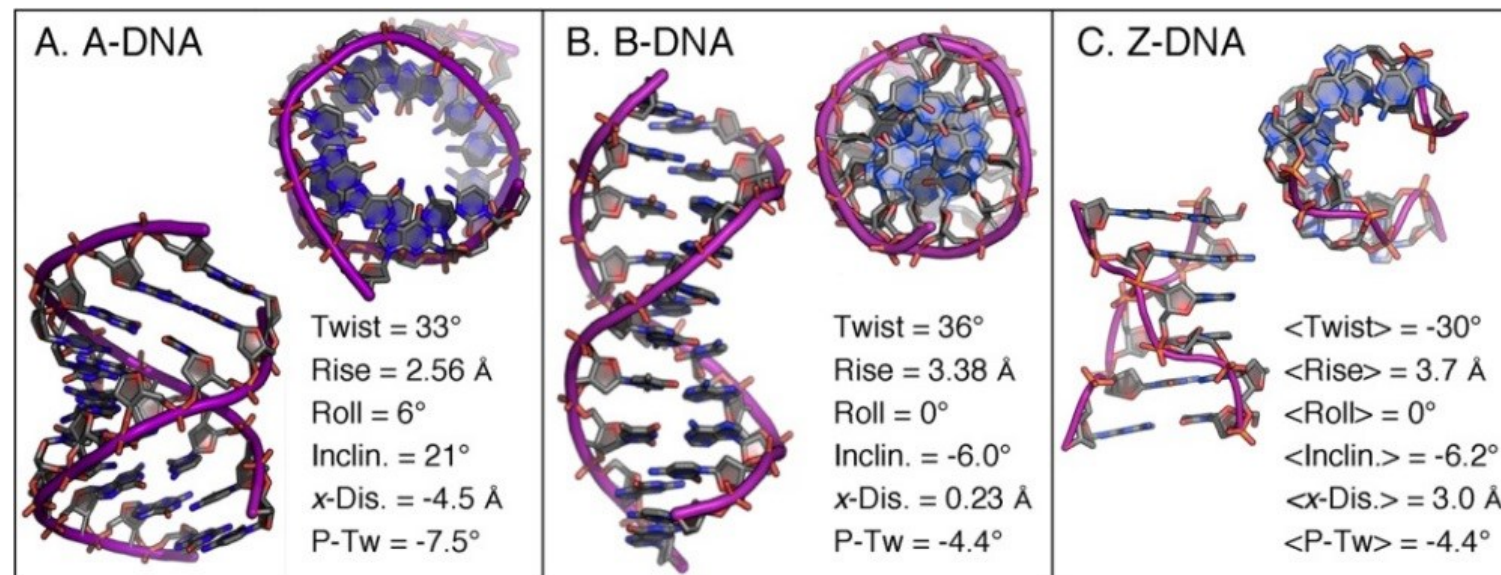
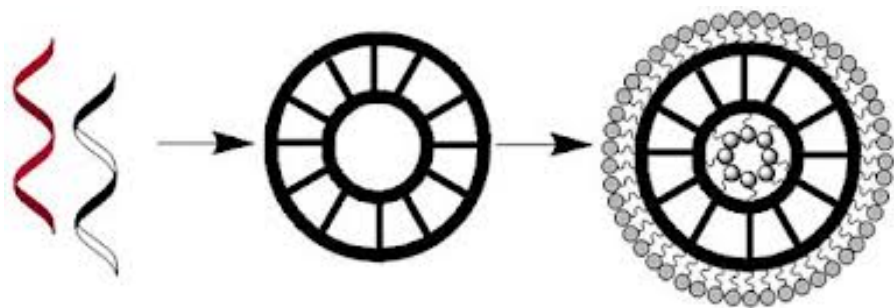
Laskavě poskytnuto prof. Vorlíčkovou

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



<https://www.ibp.cz/cs/vyzkum/oddeleni/biofyzika-nukleovych-kyselin/informace-o-oddeleni>

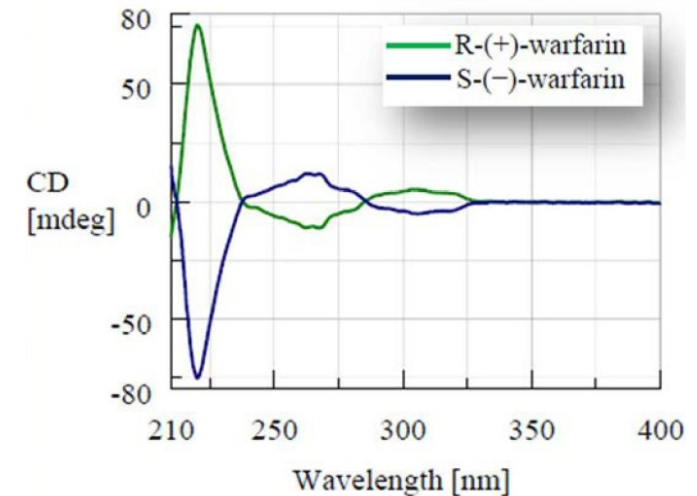
Vorlíčková, M., Kypr, J. and Sklenář, V.: NUCLEIC ACIDS: (c) SPECTROSCOPIC METHODS, Encyklopedia of Analytical Science, vol. 6, sec. ed., Elsevier, Oxford, (2005) 391-399

Cirkulární dichroismus v analýze optické čistoty léčiv

- Optická čistota léčiva (chirální organické látky) je významným aspektem sledovaným ve farmacii – předpisy FDA.
- U některých léčiv jsou biologicky aktivní i racemické směsi enantiomerů (např. Advil (u nás Ibuprofen) – obsahuje oba enantiomery Ibuprofenu), ale u většiny známých chirálních léčiv je biologicky aktivní pouze jeden z jejich enantiomerů - ten, který je schopný lépe se vázat na aktivní centrum enzymu nebo jiné cílové molekuly.
- K analýze optické čistoty chirálních léčiv se často využívají metody HPLC s použitím chirálních kolon, ale tyto metody jsou drahé (cena chirální kolony cca 55 000 Kč), časově náročné (délka analýzy cca 60 - 120 min) a většinou vyžadují použití velkého množství vzorku (100 – 500 mg). Výhodou metod jako jsou optická rotační disperze a cirkulární dichroismus je rychlost analýzy (1 – 10 min) a použití menšího množství vzorku (10 - 50 mg).
- Metoda Cirkulárního dichroismu pro analýzu optické čistoty léčiva (její varianty VCD a ECD) byla proto nedávno zařazena do Amerického lékopisu - prosinec 2016, USP kapitoly <782> a <1782> a také do Českého lékopisu – 2017, kapitola 2.2.41 .
- Příkladem chirálních organických molekul, u kterých hraje optická čistota důležitou roli v jejich biologické aktivitě, a u nichž lze velmi dobře využít metodu CD, jsou například tyto látky: Alanin, Thalidomid, Ibuprofen, Warfarin, Metamfetamin, Amfetamin, Pseudoefedrin a Diazepam.
- Zajímavé je, že u drog jako jsou Metamfetamin, Amfetamin a Pseudoefedrin jsou biologicky aktivní pouze S (-) enantiomery (tedy levotočivé), zatímco u biologicky aktivních léčiv je tomu většinou naopak a zpravidla bývají biologicky aktivnější R (+) enantiomery (tedy pravotočivé).
- Významnost analýzy optické čistoty chirálního léčiva nám, bohužel, velmi dobře dokazuje jeden z největších farmaceutických omylů - případ léčiva Thalidomid. Léčivo zvané Contergan bylo doporučeno a hojně používáno proti ranním nevolnostem u těhotných žen. Tento lék však způsobil smrt mnoha plodů a deformaci předních končetin mnoha narozených dětí. Léčivo totiž přišlo na trh (v Německu v roce 1957) jako racemická směs dvou enantiomerů a až o mnoho let později se zjistilo, že pouze R-enantiomer má požadované léčivé účinky, zatímco S-enantiomer způsobuje teratogenní deformace plodu.

CD spektrum léčiva Warfarin

(Zdroj: *Jasco Applications Book, Circular dichroism and polarimeters*)



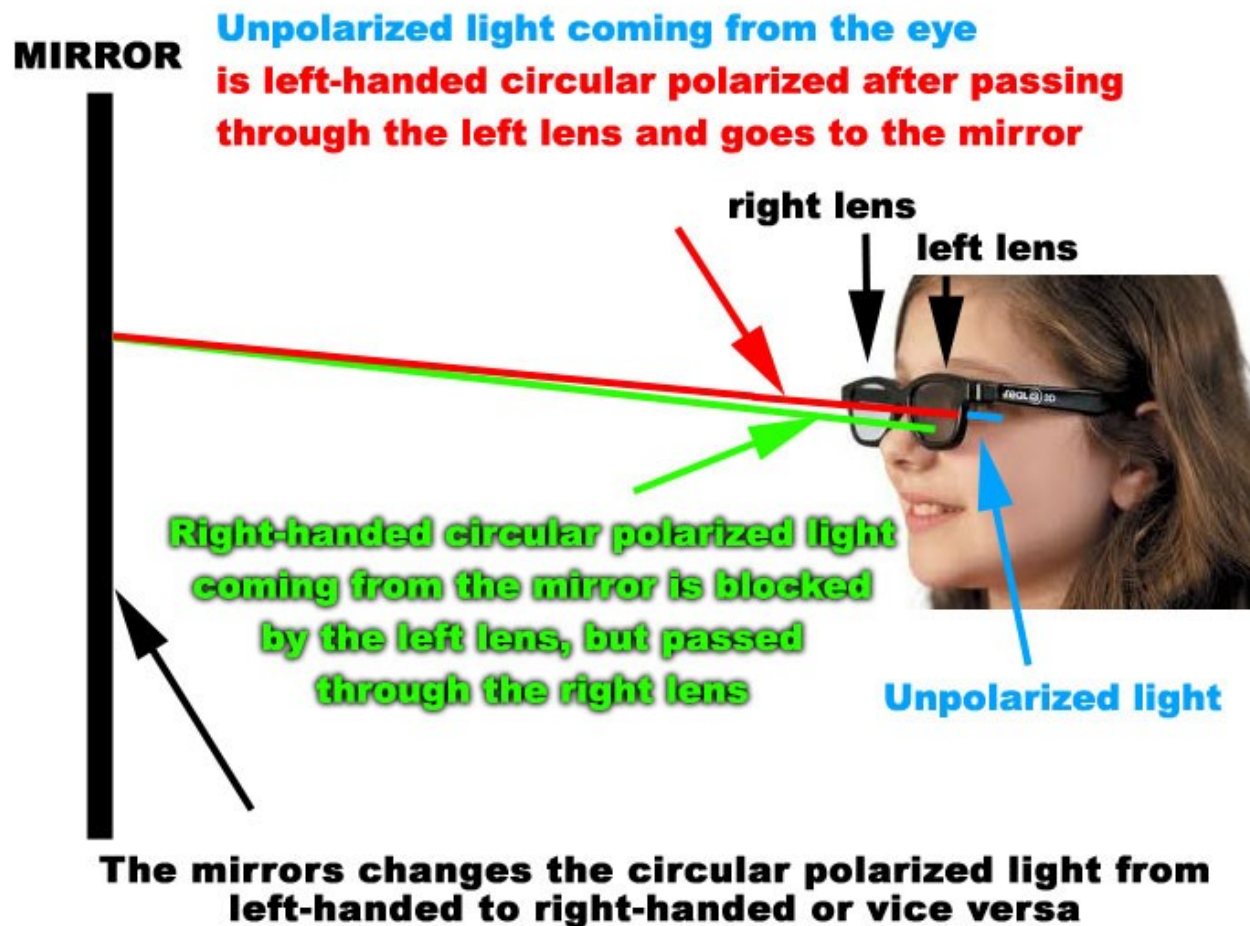
Vypracovala a laskavě
poskytla Markéta Procházková

Jak funguje sledování 3D filmů

- Na plátno se promítají obrazy pro levé a pravé oko současně
- Na brýlích je na skle pro každé oko jiný polarizátor (je lineární nebo cirkulární?)
- Složením různých obrazů pro každé oko vzniká prostorový obraz



Mrknutí v 3D brýlích před zrcadlem



Výsledný obraz



Příště: přenos síly (energie) na dálku

