

Лабораторна робота №4

Спектрофотометричне визначення концентрації нуклеїнових кислот

Основні ідеї спектрофотометричного методу визначення концентрації

Зручним і доступним методом вивчення білків і нуклеїнових кислот є оптична спектроскопія, оскільки їх оптичні спектри відображають структурні особливості молекул. Багато молекул здатні поглинати світло у видимій або ультрафіолетовій області спектру, що можна використовувати для визначення їх концентрацій.

Закон Ламберта–Бера:

поглинальна здатність речовини в розчині прямо пропорційна кількості поглинаючих центрів на шляху світлового потоку, тобто пропорційна концентрації розчину (коефіцієнт поглинання пропорційний концентрації розчину речовини)

$$k = \varepsilon \cdot c$$

Об'єднаний закон Бугера-Ламберта-Бера (Б.-Л.-Б.):

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l}; \quad \lg \frac{I}{I_0} = -\varepsilon \cdot c \cdot l; \quad \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l.$$

Оптична густина А:

$$A = \lg \frac{I_0}{I}; \quad A = -\lg T = -\lg \frac{1}{T}$$

$$\text{В результаті } A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Таким чином оптичної густини (А) пропорційна концентрації поглинаючої речовини (С), довжині оптичного шляху променя в зразку (l) і молярному коефіцієнту екстинкції (ε).

Монохроматичне світло інтенсивності I₀ проходить через прямокутну кювету з кварцу в якій знаходиться розчин досліджуваної речовини. Інтенсивність I пройденого світла, ослабленого поглинанням, вимірюється за допомогою детектора.

Відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера оптична густина А пропорційна концентрації (С, моль / л) речовини і товщині (l, см) шару розчину.

Розчин з концентрацією 1 моль/л в кюветі з товщиною 1 см володіє оптичною густиною, рівною ε, тобто ε чисельно дорівнює поглинанню 1 М розчину при довжині шляху світла 1 см. Молярний коефіцієнт ε не залежить від умов вимірювання С, l і характеризує здатність молекул даної речовини поглинати світло певної довжини хвилі. Вимірявши оптичну густина розчину (А) в кюветі з товщиною 1 см, за значенням ε можна визначити концентрацію речовини в розчині:

$$C = A / \varepsilon \text{ (моль / л)}.$$

Якщо товщина кювети не дорівнює 1 см, то:

$$C \text{ (моль / Л)} = A / \varepsilon l.$$

Оптична густина розчину (А) залежить від довжини хвилі вимірюваного світла.

Криву, яка описує цю залежність, називають **спектром поглинання**.

Спектрофотометрія нуклеїнових кислот

Характерними для нуклеїнових кислот смугами поглинання в УФ-області спектра є смуги з λ_{\max} (довжина хвилі, при якій спостерігається максимальне поглинання світла) в діапазоні 200-290 нм. Спектри поглинання однокомпонентних білків (ячний альбумін, гамма-глобулін, трипсин, пепсин та ін.) також розташовуються в області 200-290 нм, включаючи дві смуги поглинання: одну з $\lambda_{\max}=220$ нм, другу з $\lambda_{\max}=278$ нм. Смуга поглинання з $\lambda_{\max}=275$ нм обумовлена поглинанням енергії світла електронами молекул ароматичних амінокислот (триптофан, тирозин, фенілаланін). В області 240-300 нм головний внесок в спектр дає триптофан навіть при його відносно невисокому вмісті в білку, в значній мірі визначаючи характер спектру поглинання, оскільки коефіцієнт молярного поглинання є його індольного ядра в 4 рази перевищує є тирозину і майже в 30 разів є для фенілаланіну. Світлопоглинання в короткохвильовій області спектра ($\lambda < 220$ нм) пов'язане зі поглинанням хромофорами пептидної групи білкової молекули (рис.1).

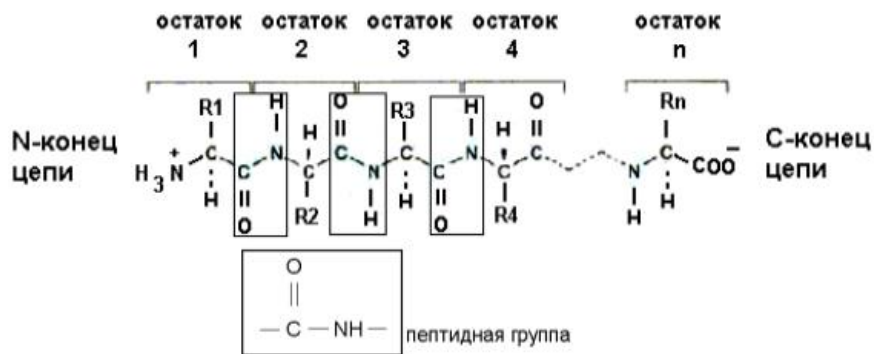


Рис.1. Пептидні групи в молекулі білка

Спектри поглинання нуклеїнових кислот, що формуються з спектрів поглинання азотистих основ, які входять до їх складу, характеризуються смугою поглинання в діапазоні 255-270 нм. Основними хромофорами нуклеїнових кислот є пуринові і піримідинові основи нуклеотидів (рис. 2).

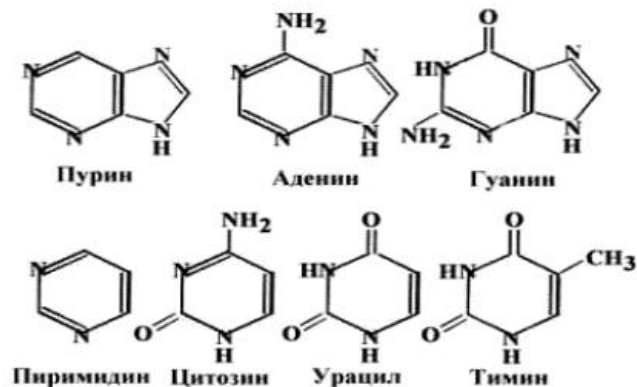


Рис.2. Структурні формули азотистих основ

До складу ДНК входять аденін, гуанін (пуринові), цитозин і тимін (піримідинові азотисті основи); в РНК замість тиміну присутній урацил. За світлопоглинання в основному відповідальна система пуринових і піримідинових кілець. Смуги поглинання азотистих основ з максимумами близько 260 нм відрізняються високою інтенсивністю.

При денатурації ДНК спостерігається зсув смуги поглинання в більш довгохвильову частину спектру з одночасним збільшенням екстинкції (поглинання).

Реєстрація та аналіз спектрів поглинання нуклеїнових кислот, а також нуклеотидів дозволяють отримати інформацію про радіаційні і фотохімічні перетворення їх молекул, їх термостабільність, стійкість ДНК і РНК по відношенню до різних денатуруючих (модифіцируючим) факторів.

У твердому вигляді ДНК завжди містить невизначену кількість води, тому необхідно визначати концентрацію ДНК шляхом вимірювання її поглинання при $\lambda = 260$ нм. Розчин, що містить 1 мг ДНК на 1 мл, характеризується оптичною густиною рівною 22 при довжині хвилі 260 нм ($A_{260} = 22$).

Метод дозволяє кількісне визначення ДНК, екстрагованої з тканин розбавлених хлорною кислотою (HClO_4) (0,25-0,65 М). Трихлороцтова кислота до концентрації 10% не впливає на результат аналізу.

Для визначення концентрації білка користуються вимірами інтенсивності поглинання світла при $\lambda = 280$ нм, що обумовлено присутністю в білку ароматичних амінокислот. Хоча кількість цих амінокислот в різних білках різна і, отже, інтенсивність поглинання світла неоднакова, в кюветі товщиною 1 см у розчині, що містить 1 мг "усередненого" білка в 1 мл, оптична густина дорівнює 1 при довжині хвилі 280 нм ($A_{280} = 1$).

Незважаючи на певні обмеження, спектрофотометричний метод застосовується дуже широко: він швидкий, не вимагає будь-яких реагентів, розчини білків-ферментів і нуклеїнових кислот після вимірювання можуть бути використані для подальшої роботи.

Визначення сумарного вмісту нуклеїнових кислот в біологічному матеріалі за фосфором

Серед складних біологічних молекул особливе значення мають нуклеопротейни, які відіграють роль у передачі спадкових ознак, при синтезі білків і в багатьох процесах обміну. Нуклеопротейди складаються з білків і нуклеїнових кислот, які в своєму складі містять азотисті основи (А, Т, Г, Ц або У, що входить в РНК). Крім того, до складу нуклеїнових кислот (НК) входять вуглеводи (моносахариди - пентоза) і фосфорна кислота (рис.3.).

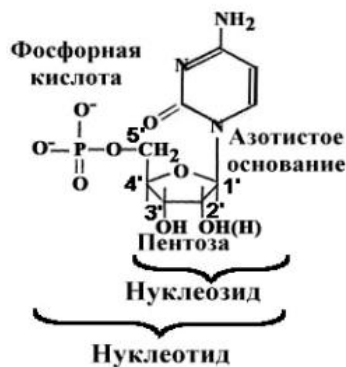


Рис.3. Будова нуклеотиду-мономера нуклеїнових кислот.

Розрізняють РНК (РНК) і дезоксирибонуклеїнові (ДНК) кислоти, які відрізняються не тільки за вмістом У і Т, а й в залежності від вхідного моносахариду - рибози (РНК) і дезоксирибози (ДНК) (рис.4).

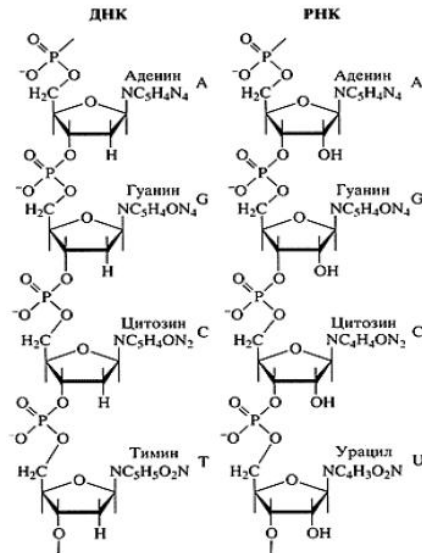


Рис.4. Відмінності в первинній структурі ДНК і РНК.

Оскільки всі три компоненти (азотисті основи, вуглеводи і фосфорна кислота) входять до складу нуклеїнових кислот завжди в постійних молярних концентраціях (в співвідношенні 1: 1: 1), визначення нуклеїнових кислот проводять, досліджуючи вміст одного з компонентів, зокрема, фосфору.

Ідея методу спектрофотометричного визначення концентрації нуклеїнових кислот

Принцип методу базується на екстракції нуклеїнових кислот (сумарної кількості РНК і ДНК) гарячою хлорною кислотою (HClO_4) при нагріванні з наступним визначенням нуклеїнового фосфору (Фн) в розчині методом фотометрування в ультрафіолетовій області з визначенням оптичної густини при довжинах хвиль 270 і 290 нм:

$$C \text{ (мкг/мл)Фн} = (A_{270} - A_{290}) / 0.19, \text{ де}$$

коефіцієнт 0,19 - це значення ΔA , при якому гідролізат містить 1 мкг НК в 1 мл розчину.

За концентрацією Фн обчислюють вміст нуклеїнових кислот:

$$C \text{ (мкг / мл) НК} = C \text{ (мкг/мл)Фн} \times 10.3,$$

де 10,3 - коефіцієнт перерахунку на суміш НК.

Можна визначати окремо вміст ДНК і РНК, вимірюючи величину поглинання розчину при значеннях λ_{max} рівних 270 і 290 нм з врахуванням коефіцієнтів перерахунку для ДНК ($k=10,1$) і РНК ($k=10,5$). Розрахунок проводять за рівнянням :

$$C = (A_{270} - A_{290}) \times k \times V / 190,$$

де C - концентрація нуклеїнових кислот в мг / мл; A - оптична густина при відповідній довжині хвилі; k - коефіцієнт перерахунку по фосфору нуклеїнової кислоти (для ДНК $k=10,1$ для РНК $k=10,5$); V - об'єм досліджуваної проби; 190 - коефіцієнт поглинання 1 мг Фн в 1 мл розчину. Похибка методу <10%.

Устаткування:

Спектрофотометр; кварцові кювети; центрифуга; водяна баня; мірний посуд - циліндри або пробірки на 25-50мл (2 шт.); пробірки; склянки, піпетки; скляні палички; маркер; фільтрувальний папір.

Реактиви:

Проба крові або наважка м'язової тканини; 0,2Н, 0,5Н і 0,6Н розчини хлорної кислоти; дистильована вода (dH_2O).

Завдання 1. Визначення концентрації нуклеїнових кислот в крові

Схема роботи:

1. Приготувати дві проби гемолізату крові. Для цього взяти два циліндра (I, II) на 25-50 мл і в кожен додати по 0,1 мл крові (по стінці пробірки), потім - по 1,4 мл дистильованої (дН₂O). Додавати воду строго над краплею крові, по стінці пробірки.
2. До гемолізатів додати 13,5 мл 0,6 Н хлорної кислоти (вливати по стінці пробірки), перемішати.
3. Пробірку з пробою I помістити на 20 хв в киплячу водяну баню (Пробу II не гріти!). За цей час відбувається повний гідроліз нуклеїнових кислот, пов'язаних з білками, і осадження білків.
4. Після завершення гідролізу пробірку охолодити під струменем води з-під крана.
5. Перелити охолоджений вміст I проби і II (контрольної) проби в центрифужні пробірки. Центрифужні пробірки врівноважити.
6. Центрифугувати 10-15 хв при 3000 об / хв (20° С).
7. Рідину з обох пробірок злити в кювети для фотометрування

Обробка результатів:

1. Виміряти оптичну густину розчинів I і II проб при $\lambda=270$ і $\lambda=290$ нм. Контрольна проба, відносно якої здійснюється спектрофотометричний аналіз – 0,6 н розчин хлорної кислоти.
2. Розрахувати сумарний вміст нуклеїнових кислот в пробірках з урахуванням розведення проби крові за рівнянням :

$$X = (A-B) \times \Gamma \times 10,3 \times 100 / (0,19 \times V) = \text{мг\%},$$

де А та Б- різниця між оптичними густинами досліджуваного розчину при $\lambda=270$ і $\lambda=290$ нм; 0,19 поправка при вимірювання оптичної густини; Γ –об'єм розчину крові з хлорною кислотою; V – об'єм крові, взятої для дослідження, (відношення Γ/V -розведення вихідної проби); 10,3 - коефіцієнт перерахунку на кількість нуклеїнових кислот; 100 - коефіцієнт для перерахунку в відсотки.

Зробити висновки про отримані результати.

Завдання 2: Визначення концентрації нуклеїнових кислот в м'язовій тканині

Схема роботи:

1. 10 і 500 мг м'язової тканини помістити в центрифужні пробірки.
2. Додати по 10 мл 0,2 Н хлорної кислоти. Перемішати скляною паличкою.
3. Осадок відокремити центрифугуванням при 3000 об / хв протягом 5 хв (20°C). Осад повторно відмити.
4. До осадів додати по 10 мл 0,5 Н розчину хлорної кислоти, нагрівати протягом 30 хв у киплячій бані.
5. Гідролізат охолодити під струменем холодної води і центрифугувати при 3000 об / хв протягом 5 хв (20°C)
6. Перелити надосадову рідину в кювети для фотометрії скляні пробірки і виміряти оптичну густина розчинів (A_{270} і A_{290}); контроль 0,5 Н розчин хлорної кислоти

Обробка результатів:

Розрахувати концентрацію ДНК і РНК. Оскільки нуклеїнові кислоти екстраговані з тканини, зробити розрахунок за формулою:

$$C = (A_{270} - A_{290}) \times k \times V / 190, \text{ де}$$

C - концентрація нуклеїнових кислот в мг / мл; A - оптична густина при відповідній довжині хвилі; k - коефіцієнт перерахунку по фосфору нуклеїнової кислоти (для ДНК $k=10,1$ для РНК $k=10,5$); V - об'єм досліджуваної проби; 190 - питома екстинкція 1 мг фосфору нуклеїнової кислоти в 1 мл розчину.

Зробити висновки про отримані результати.