



Методы определения концентрации нуклеиновых кислот. Методы определения концентрации белков.

Спецпрактикум по биохимической генетике - Лекция 8
Старший преподаватель: PhD, Сmekенов Изат Темиргалиевич
Кафедра молекулярной биологии и генетики



ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Познакомить студентов с основными физико-химическими и спектрофотометрическими методами количественного определения нуклеиновых кислот и белков, их принципами, применением и ограничениями.

ЗАДАЧИ

- ✓ Объяснить принцип работы спектрофотометрии и закон Бугера–Ламберта–Бера.
- ✓ Определять концентрацию ДНК, РНК и белков по оптической плотности при разных длинах волн (A_{260} , A_{280} , A_{230}).
- ✓ Интерпретировать соотношение A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} для оценки чистоты образцов.
- ✓ Отличать прямые и косвенные методы количественного анализа биомолекул.
- ✓ Описывать метод Брэдфорда, Биуретовый метод, метод Лоури, ВСА-тест.
- ✓ Работать с наноспектрофотометрами (NanoDrop) и кюветными спектрофотометрами.
- ✓ Выбирать подходящий метод в зависимости от типа образца, его концентрации и наличия примесей.

Ключевые термины

Спектрофотометрия, Закон Бугера–Ламберта–Бера, Оптическая плотность (OD) A_{260} , A_{280} , A_{230} , Чистота нуклеиновых кислот, NanoDrop, Метод Брэдфорда, Метод Лоури, ВСА-метод, Биуретовая реакция, Концентрация, ДНК/РНК Белки, пептиды, Интерференция, реагентов (EDTA, фенол, гуанидин, детергенты).

Спектрофотометрия и Закон Бугера–Ламберта–Бера

1. Позволяет **определять концентрацию молекул по поглощению света**.
2. Закон: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, где A — оптическая плотность, ϵ — молярный коэффициент поглощения, c — концентрация, l — длина пути света.

Оптическая плотность (OD) и оценка нуклеиновых кислот

1. A260 — используется для измерения ДНК и РНК.
2. A280 — отражает присутствие белков.
3. A230 — учитывает загрязнения фенолом, гуанидином и детергентами.
4. Чистота нуклеиновых кислот оценивается по соотношениям: A260/A280 (~1.8 для ДНК, ~2.0 для РНК), A260/A230 (>1.8).
5. NanoDrop — микрообъемный спектрофотометр для быстрого анализа.

Методы количественного определения белков

1. Метод Брэдфорда: основан на связывании красителя Coomassie Brilliant Blue с белком; изменения поглощения при 595 нм.
2. Метод Лоури: цветовая реакция белка с фосфорвольфрамовой и фосформолибденовой кислотой, детекция при 750 нм.
3. BCA-метод (Bicinchoninic acid): на основе биуретовой реакции; детекция при 562 нм.
4. Биуретовая реакция: взаимодействие пептидных связей с медью (II), образование фиолетового комплекса.

Концентрация и интерференция

1. Концентрация ДНК/РНК, белков и пептидов измеряется спектрофотометрически или с помощью колориметрических методов.
2. Важно учитывать интерференцию реагентов (EDTA, фенол, гуанидин, детергенты), которые могут влиять на показания OD или окрашивание.



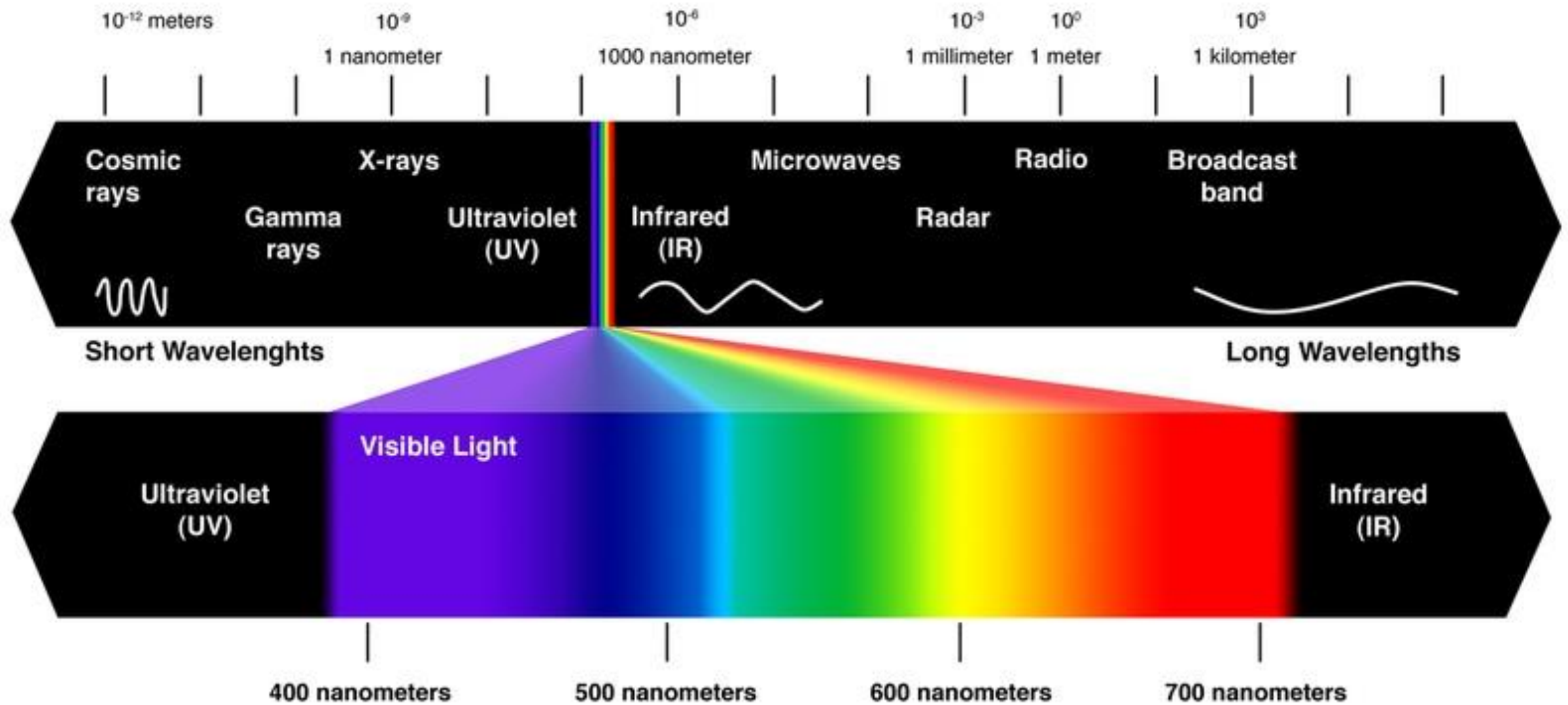
ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Какой принцип лежит в основе закона Бугера–Ламберта–Бера? Для чего измеряют OD при 260, 280 и 230 нм?
- 2) Как оценивают чистоту нуклеиновых кислот по соотношениям A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} ?
- 3) Чем отличается NanoDrop от обычного спектрофотометра?
- 4) Какие основные методы количественного анализа белков и их принципы (Bradford, BCA, Biuret, Lowry)?
- 5) Какие реагенты могут вызывать интерференцию при измерении концентрации ДНК, РНК и белков?
- 6) Как выбрать подходящий метод определения концентрации для конкретного образца (нуклеиновая кислота или белок)?

Спектрофотометры

- Основное отличие спектрофотометра от фотоколориметра состоит в возможности пропустить через исследуемый образец световой поток любой требуемой длины волны, проводить фотометрические измерения, сканируя (просматривая) весь диапазон длин волн не только видимого (VIS) света - от 380 до 750 нм, но и ближнего ультрафиолета (UV) - от 200 до 380 нм.

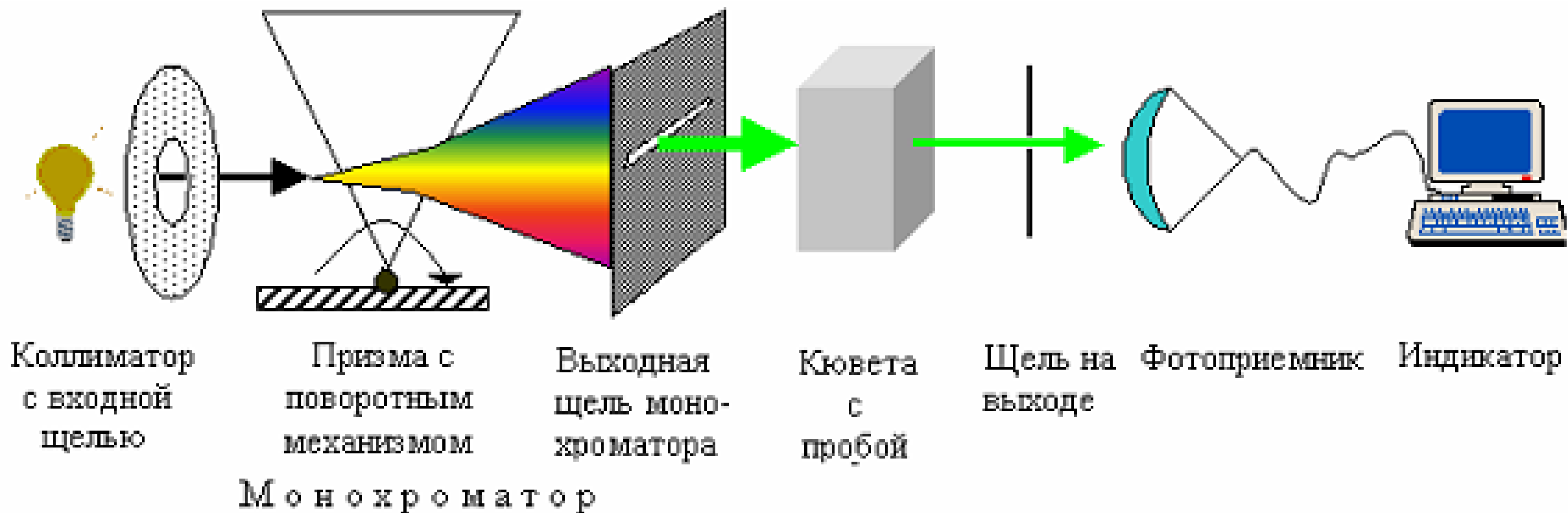


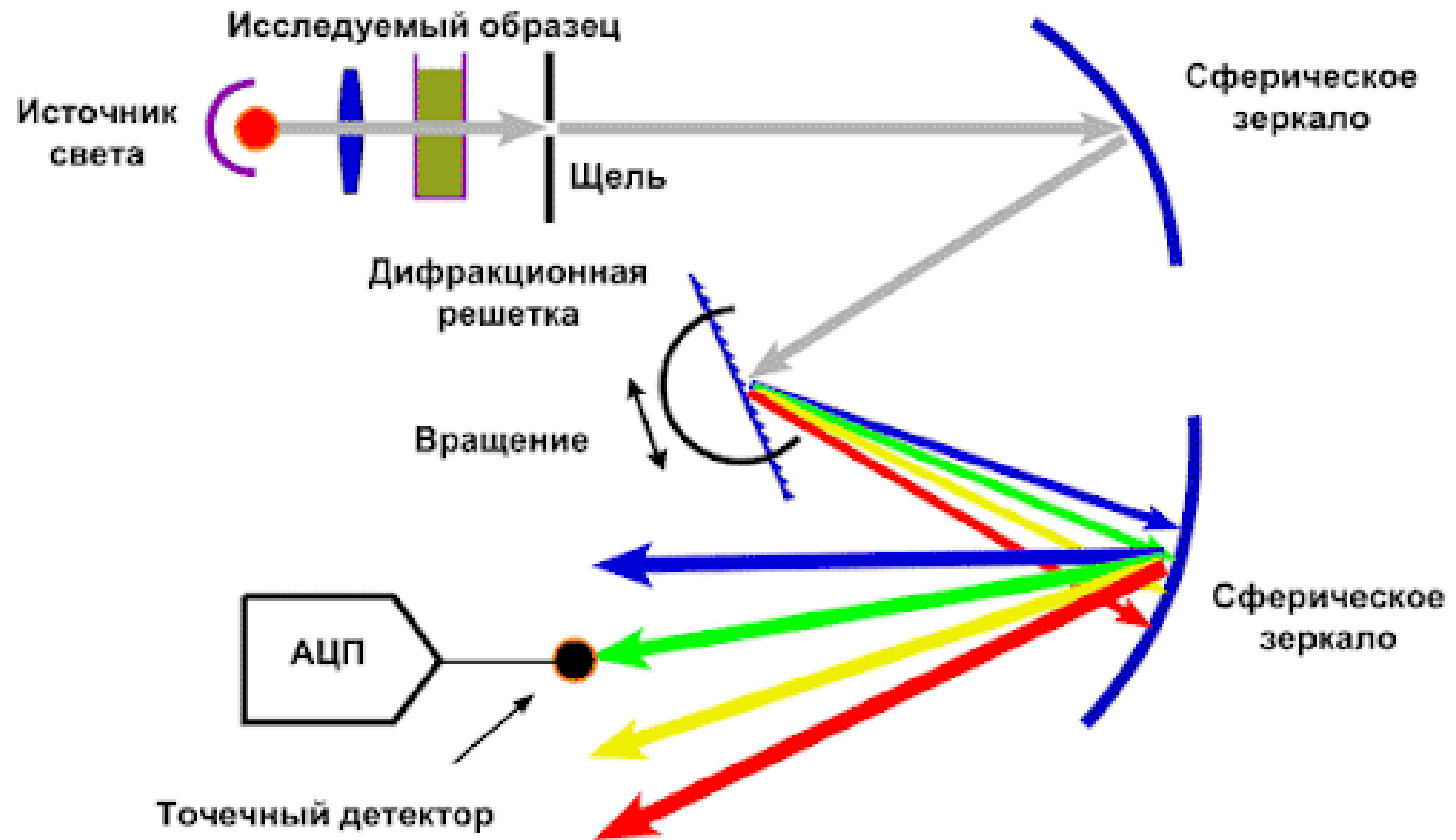


Принцип работы спектральных приборов

- Спектрофотометры позволяют разлагать белый свет в непрерывный спектр, выделять из этого спектра узкий интервал длин волн, в пределах которого световой пучок можно считать монохроматическим (ширина выделяемой полосы **спектра 1 – 20 нм**), пропускать изолированный пучок света через анализируемый раствор и измерять с высокой степенью точности интенсивность этого пучка.
- Поглощение света окрашенным веществом в растворе измеряют, сравнивая его с поглощением нулевого раствора. В фотометрическом спектрофотометре сочетаются два основных прибора: **монохроматор**, служащий для получения монохроматического светового потока, и фотоэлектрический **фотометр**, предназначенный для измерения интенсивности света.

Для разложения света в спектр применяются стеклянные и кварцевые призмы, а также дифракционные решетки. Призмы обладают довольно большой дисперсией и большой светосилой. Кварцевые призмы дают возможность работать в ультрафиолетовой области спектра. Очень важной деталью спектрофотометра является щель, с помощью которой можно регулировать интенсивность светового потока: чем меньше ее раскрытие, тем меньше света проходит через нее и тем уже интервал длин волн светового пучка, пропускаемого щелью.





*Цвета составляющих света указаны условно

Источник
света

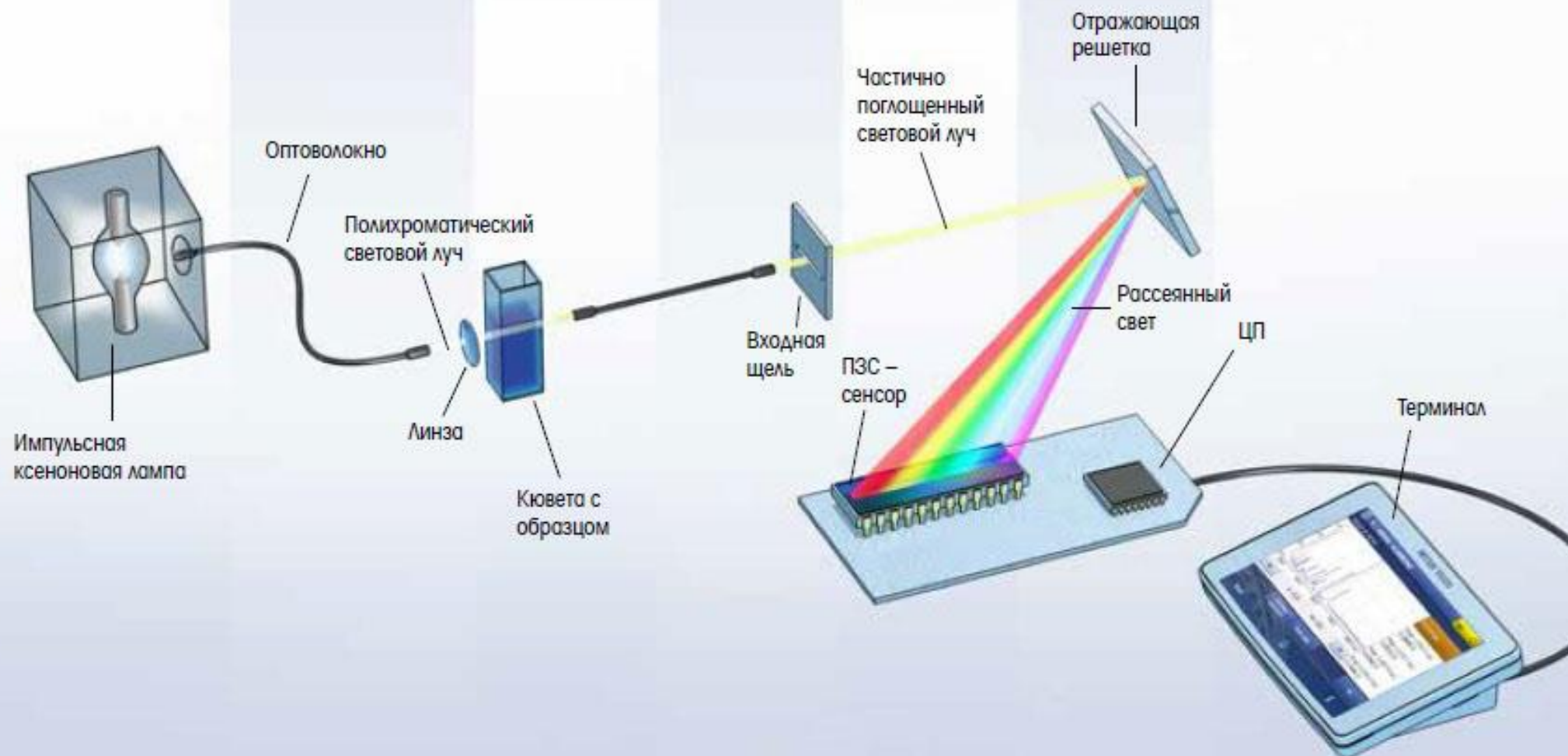
Направление
света

Образец

Детектор

Рассеянный
свет

Обработка и
отображение



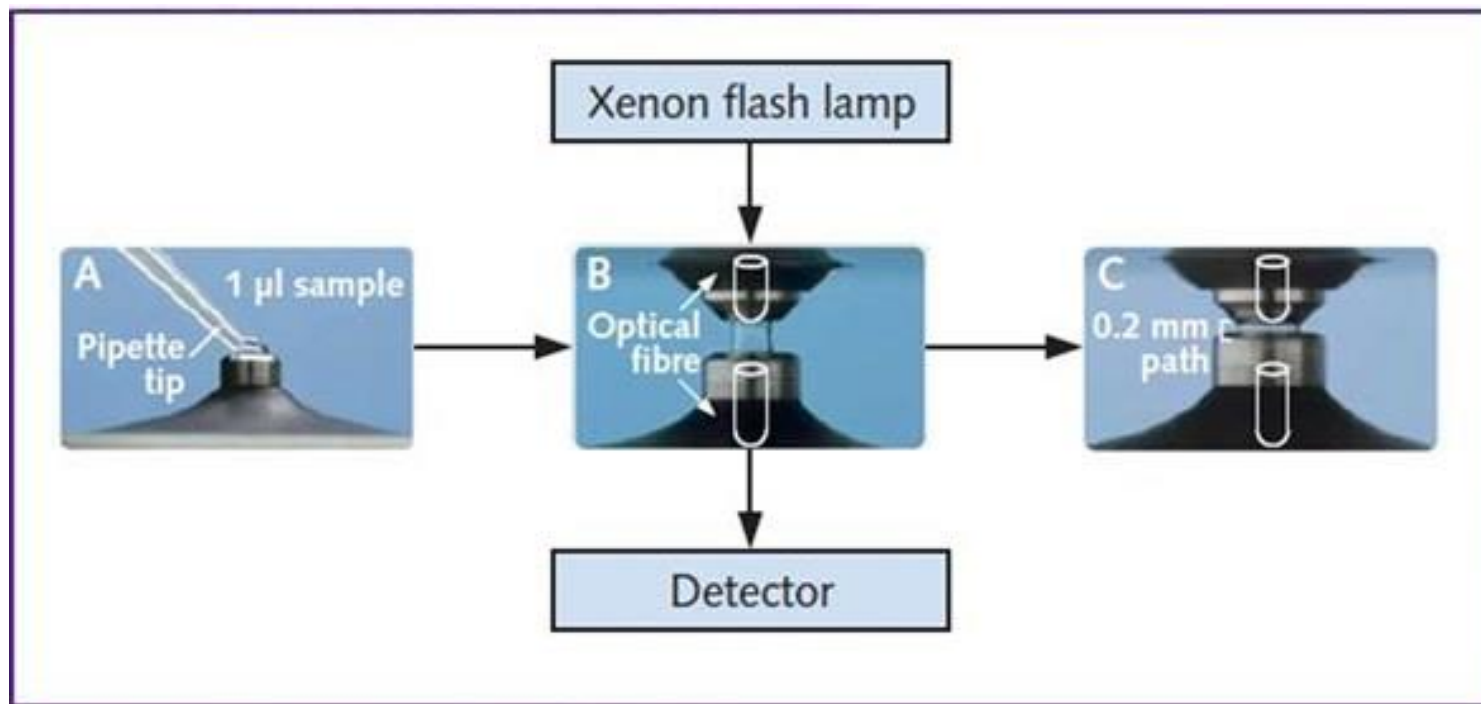
Кюветы

- Как известно исследуемый образец помещается в специальные приставки. Для каждого вида образцов они разные.
- При спектральных измерениях жидких образцов используются специальные контейнеры из кварцевого стекла (есть пластиковые), так называемые кюветы.
- В большинстве спектрофотометров применяются стандартные кюветы, которые предназначены для такого размещения, которое предусматривает горизонтальную траекторию луча света. Основным недостатком подобных кювет является то, что только небольшая часть образца (около 10%) освещается измеряющим светом.
- В случае большой ценности образца или доступности его в небольшом объеме, можно использовать микрокюветы или ультрамикрокюветы с объемом 50 или даже 2,5 мкл. Кюветы очень маленьких объемов проявляют капиллярные свойства, и возникают проблемы с образованием пузырьков воздуха, что требует дегазации. Наконец, из таких кювет сложно извлечь обратно образец.





Nanodrop - одно из моих любимых устройств в лаборатории. Взамен только 1 мкл образца, вы не только получаете измерения концентраций, но и определяется чистота образца.



Спектрофотометр NanoDrop OneC

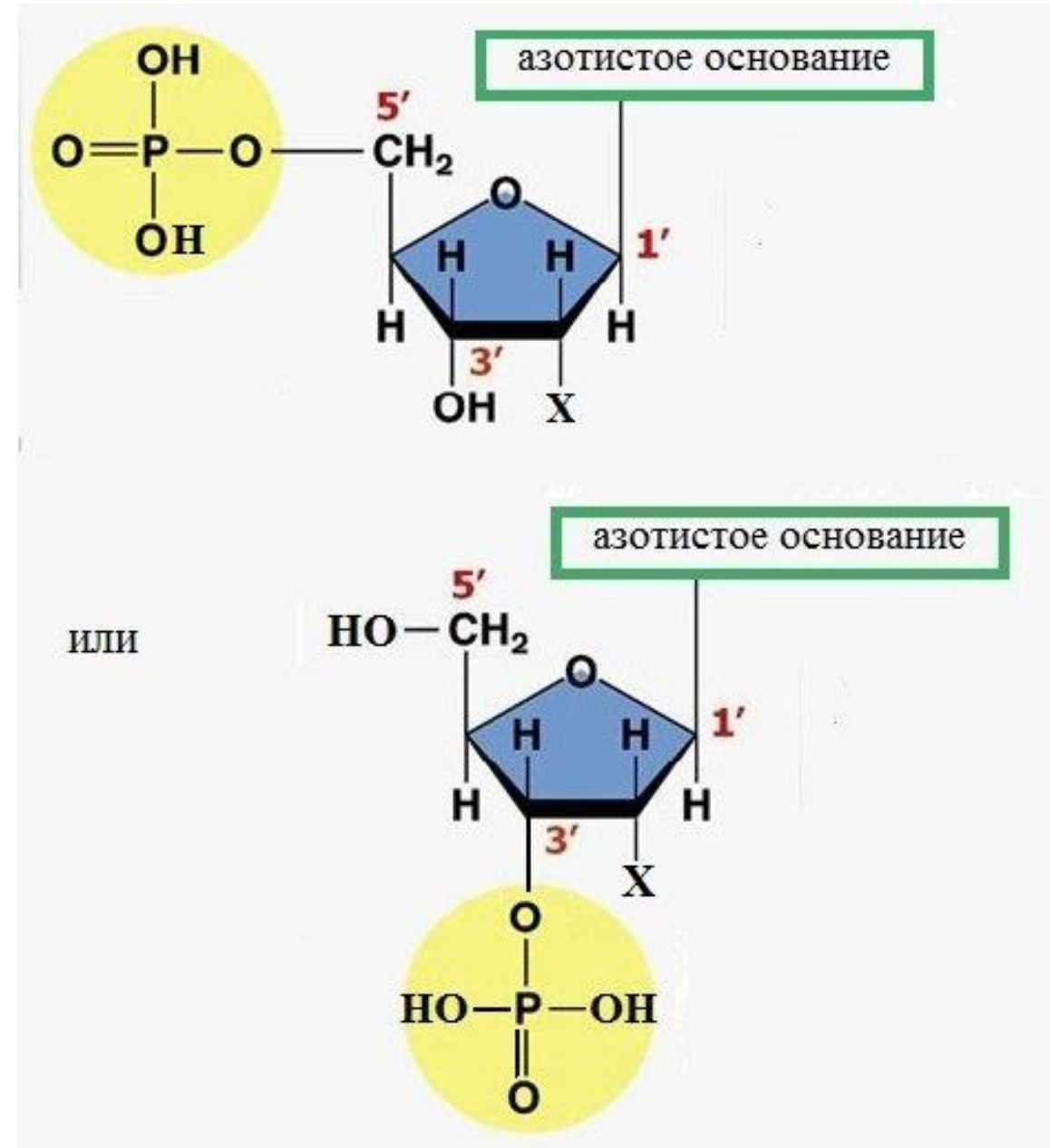
- Спектрофотометр NanoDrop OneC позволяет измерять содержание биологически значимых молекул в микрообъемах (1-2 мкл) и кюветах, это позволяет получить данные при работе с микрообъемами образцов. Встроенный планшет и передача данных по Wi-Fi устраняет необходимость подключения к ПК. Ускорить анализ позволяют функции автоизмерения и автобланкирования после опускания крышки. Благодаря широкому диапазону измерения для работы прибора не требуется разведения образцов с высокой концентрацией. Технология исследования образцов Thermo Scientific Acclaro: Автоматическая идентификация загрязняющих агентов и исправление результатов концентрации вашего образца.
- Мгновенное оповещение об отклонениях и доступ к технической поддержке и интегрированному руководству по устранению ошибок.
- Целостная картина измерений с анализом цифровых изображений.

Особенности Nano Drop OneC:

- Позволяет работать как с микрообъемами в капле так и со стандартными кюветами.
- Измеряет разбавленные образцы, выполняет кинетические измерения и измерения оптической плотности бактериальных культур.
- Позволяет контролировать температуру нагрева кюветы (до 37°C)



- **Нуклеиновая кислота** — высокомолекулярное органическое соединение, биополимер (полинуклеотид), образованный остатками нуклеотидов.
- Нуклеиновые кислоты **ДНК** и **РНК** присутствуют в клетках всех живых организмов и выполняют важнейшие функции по хранению, передаче и реализации наследственной информации.
- **Что можно измерить?**
 - дцДНК
 - оцДНК
 - Олигонуклеотиды (праймеры)
 - Тотальная РНК



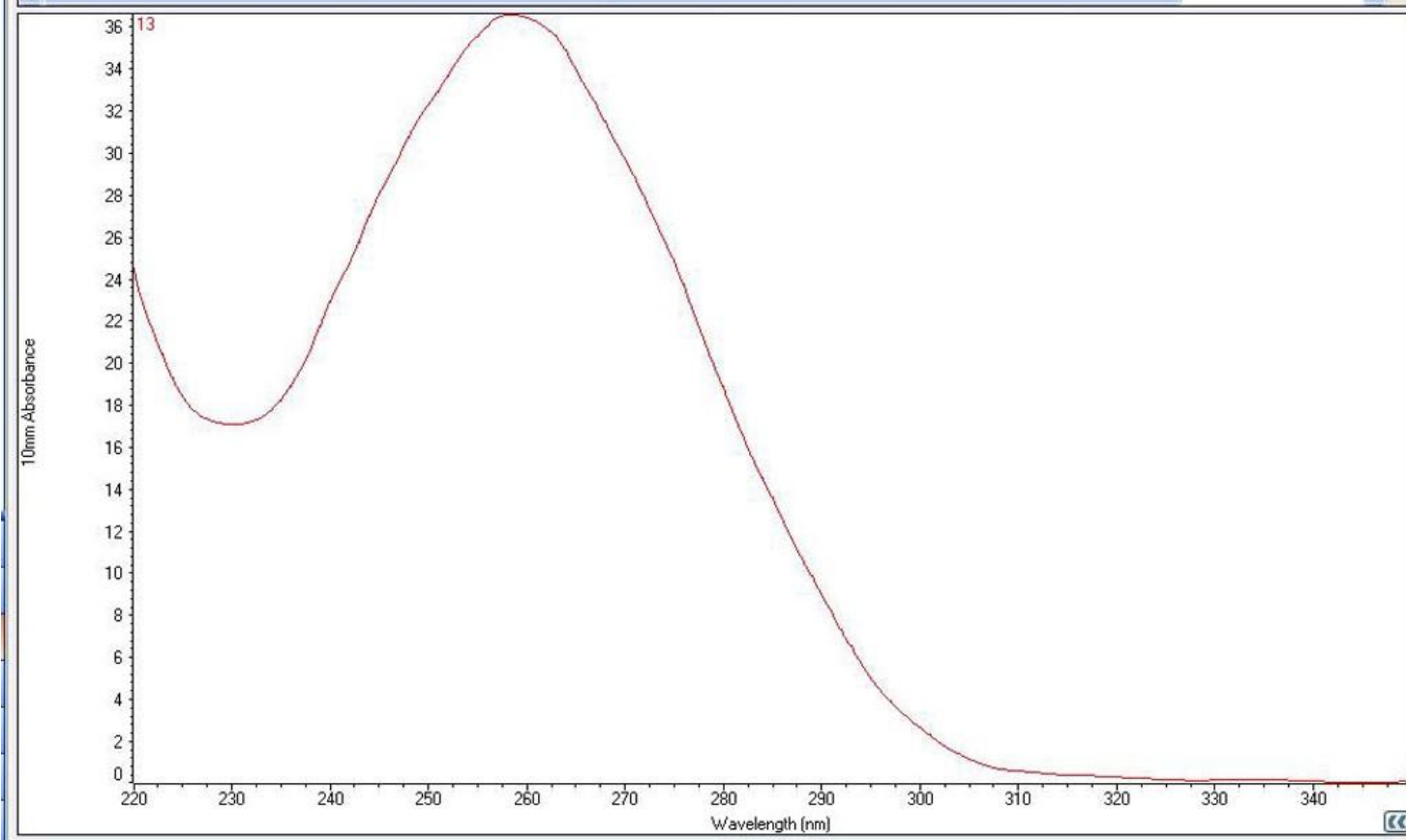
Определение концентрации нуклеиновых кислот и чистоты препарата

- Метод определения концентрации нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) в растворе основан на существовании у ДНК и РНК максимума поглощения при длине волны 260 нм. Это означает, что в растворах нуклеиновых кислот максимальная фотометрическая абсорбция наблюдается при 260 нм и прямо коррелирует с концентрацией ДНК или РНК.

Определение чистоты препарата ДНК или РНК

- **Отношение поглощения** при длинах волн 260 нм и 280 нм ($260\text{нм}/280\text{нм}$) показывает чистоту препарата ДНК или РНК. Препарат считается чистым, если отношение значений $260\text{нм}/280\text{нм}$ приблизительно равно **1.8 для ДНК** и **2.0 для РНК**.
- В случае меньших значений показателя $260\text{нм}/280\text{нм}$ препарат содержит большое количество примесей белка, фенола или иных контаминирующих агентов, имеющих значительное поглощение при 280 нм.
- Другим показателем чистоты препарата ДНК или РНК является отношение значений поглощения **$260\text{нм}/230\text{нм}$** . В случае чистого препарата это соотношение обычно равно **1.8 – 2.2**. Меньшие значения коэффициента $260\text{нм}/230\text{нм}$ свидетельствуют о загрязнении препарата компонентами, которые остаются после процедуры выделения ДНК или РНК.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sampl
10	5		3/15/2018 2:30 PM	522.8	ng/μl	13.069	7.107	1.84	1.68	RNA
11	5		3/15/2018 2:31 PM	519.0	ng/μl	12.975	7.044	1.84	1.68	RNA
12	6		3/15/2018 2:31 PM	471.0	ng/μl	11.774	6.308	1.87	1.85	RNA
13	6		3/15/2018 2:32 PM	471.8	ng/μl	11.796	6.376	1.85	1.90	RNA
14	7		3/15/2018 2:33 PM	231.3	ng/μl	5.782	3.151	1.83	1.50	RNA
15	7		3/15/2018 2:33 PM	231.8	ng/μl	5.795	3.161	1.83	1.42	RNA
16	7		3/15/2018 2:33 PM	376.3	ng/μl	9.407	5.218	1.80	1.81	RNA
17	7		3/15/2018 2:34 PM	382.8	ng/μl	9.571	5.321	1.80	1.78	RNA
18	9		3/15/2018 2:35 PM	937.2	ng/μl	23.431	12.228	1.92	2.15	RNA
19	9		3/15/2018 2:35 PM	927.2	ng/μl	23.181	12.178	1.90	2.14	RNA
20	10		3/15/2018 2:36 PM	981.7	ng/μl	24.542	12.921	1.90	2.11	RNA
21	10		3/15/2018 2:36 PM	931.4	ng/μl	23.285	12.282	1.90	2.12	RNA
22	11		3/15/2018 2:37 PM	1282.2	ng/μl	32.055	16.635	1.93	2.15	RNA

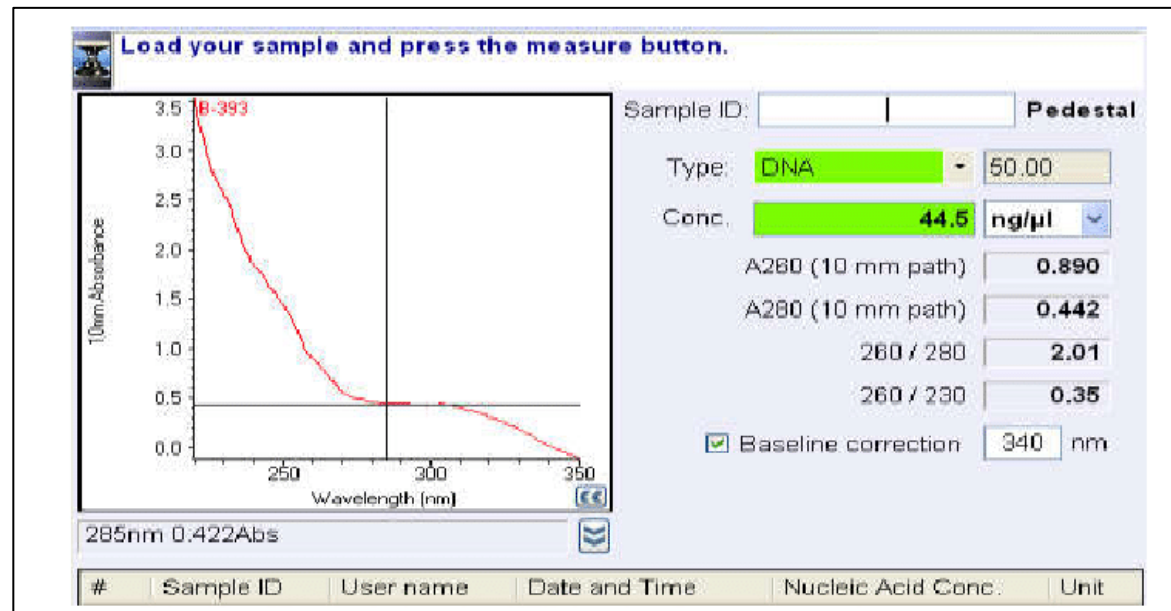
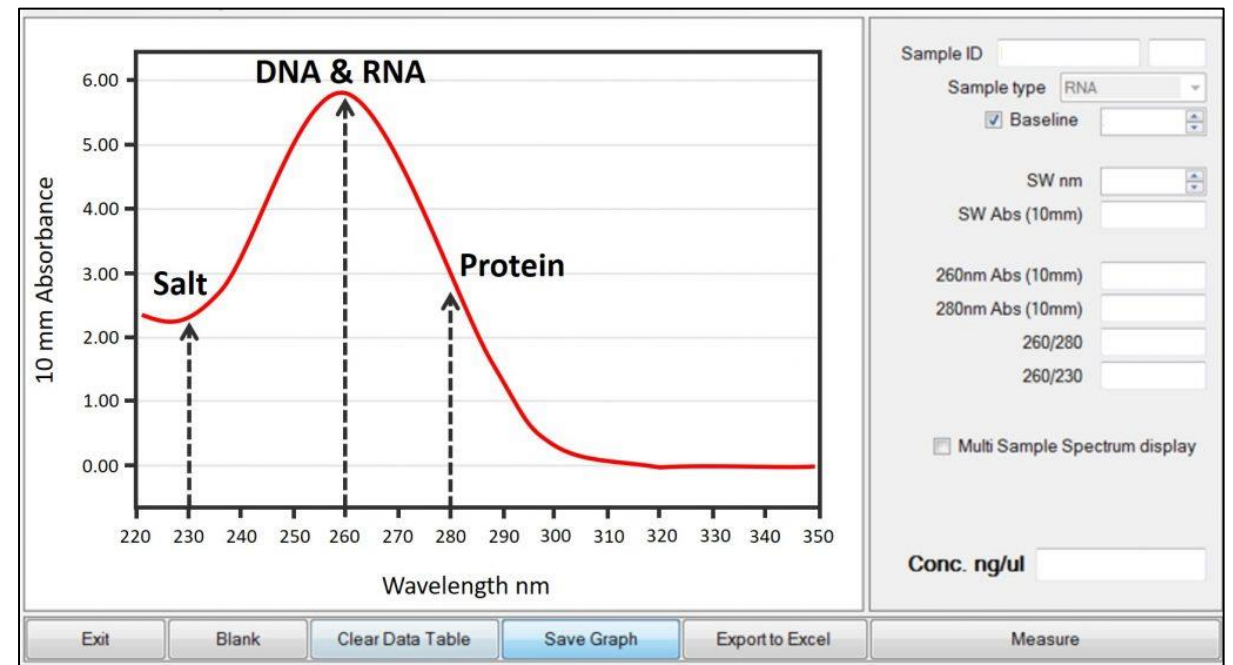
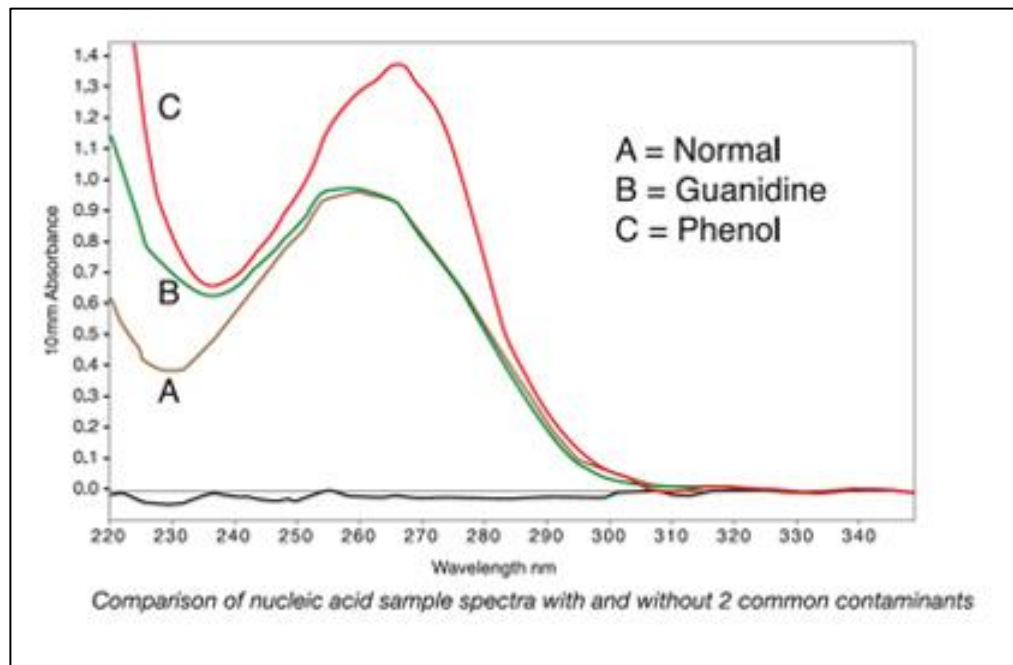


Оптимальное соотношение 260/280 зависит от того, что вы измеряете: РНК или ДНК. Эти значения следующие:

ДНК: 1,80

РНК: 2,00

Обратите внимание, что кривая, заданная Nanodrop, на самом деле может быть действительно информативной, поэтому не просто сосредоточьтесь на отношениях. Кривая, которую вы должны ожидать, аналогична приведенной выше. Должен быть хороший пик при 260 нм, который указывает на присутствие нуклеиновых кислот и никаких пиков в других местах. Если на кривой имеются двойные пики или сдвиги, это важные признаки того, что образец не является чистым.



- Концентрации нуклеиновых кислот могут быть напрямую рассчитаны по их измеренным значениям оптической плотности при 260 нм с использованием уравнения Бера-Ламберта:

$$C = \frac{A}{\epsilon L}$$

• где:

- C = концентрация нуклеиновой кислоты в молях (M)
 - A = УФ-поглощение в единицах поглощения (AU)
 - ϵ = молярный коэффициент поглощения (или коэффициент экстинкции), зависящий от длины волны, в $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 - L = световой путь в см (cm)
- Этот расчет концентрации автоматизирован во многих инструментах.

$$C_{dsDNA} = \frac{A}{0.02 (\mu\text{g/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}} = A \times 50 \mu\text{g/mL (or ng/}\mu\text{L)}$$

Чтобы значения были полезны, показание A_{260} должно находиться в линейном диапазоне прибора (обычно 0,1–1,0).

Концентрация НК (мкг/мл) = $A_{260} \times \text{фактор разбавления} \times \text{константа}$

Nucleic Acid Type	Average Extinction Coefficient ($\mu\text{g/mL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$) if OD=1*
Double-stranded DNA	0.020	50
Single-stranded DNA	0.027	37
Single-stranded RNA	0.025	40

Таблица 1. Общепринятые коэффициенты экстинкции при известной концентрации.

* На основе длины пути 1 см.

Метод:

- При постановке измерения образец ДНК разбавляют дистиллированной водой в 40 раз (к 5 мкл раствора ДНК добавляют 195 мкл воды). Измерение поглощения при 260 нм проводят в кювете с длиной оптического пути 1 мм, используя воду в качестве референса. Значение концентрации ДНК в исходном растворе (мкг/мкл) находят, умножая значение поглощения при длине волны 260 нм на $K=20$.
- РНК разбавляют водой в 10 раз (к 20 мкл раствора ДНК добавляют 180 мкл воды). Измерение поглощения при 260 нм проводят в кювете с длиной оптического пути 1 мм, используя воду в качестве референса. Значение концентрации РНК в исходном растворе (мкг/мкл) находят, умножая значение поглощения при длине волны 260 нм на $K=4$.

Задача № 1

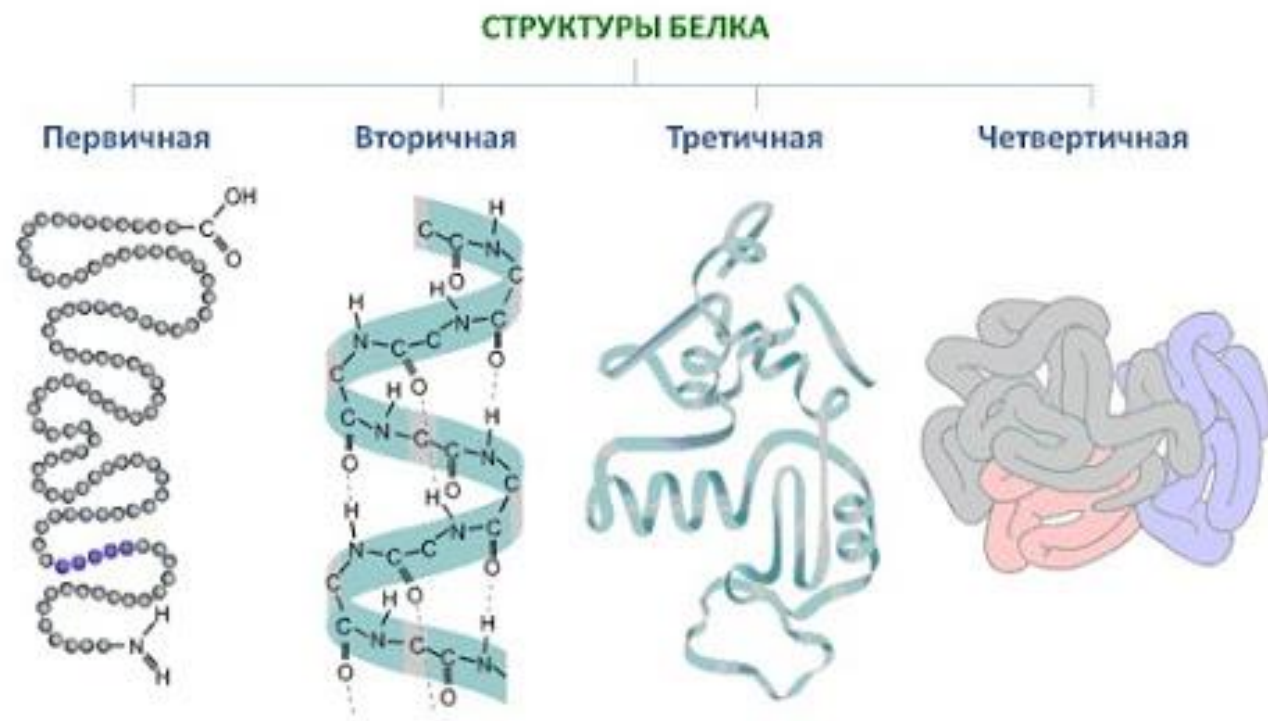
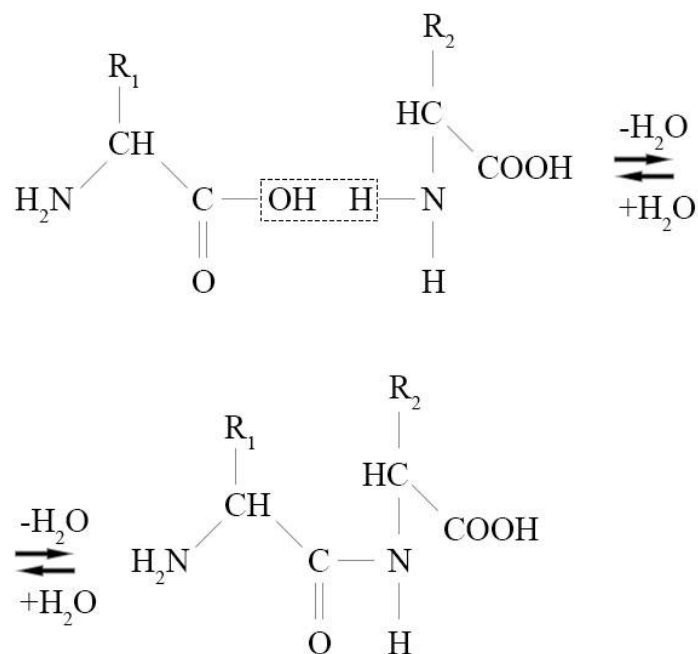
- Рассчитайте количество следующих нуклеиновых кислот в 50 мкл: дцДНК ($A_{260} = 0,32$), оцДНК ($A_{260} = 0,25$) и РНК ($A_{260} = 0,47$).
- Если известно, что была использована кювета с длиной волны 1 см, общим рабочим объемом 200 мкл и объем каждой НК в образце составляло 10% от общего объема.

Ответ к Задаче № 1

- дцДНК ($A_{260} = 0,32$) $\rightarrow 16 \text{ мкг/мл} \rightarrow 16 \text{ мкг/50 мкл} - 0,8*10$
- оцДНК ($A_{260} = 0,25$) $\rightarrow 9,25 \text{ мкг/мл} \rightarrow 9,25 \text{ мкг/50 мкл} - 0,462*10$
- РНК ($A_{260} = 0,47$) $\rightarrow 18,8 \text{ мкг/мл} \rightarrow 18,8 \text{ мкг/50 мкл} - 0,376*10$

ОБЩИЙ БЕЛОК

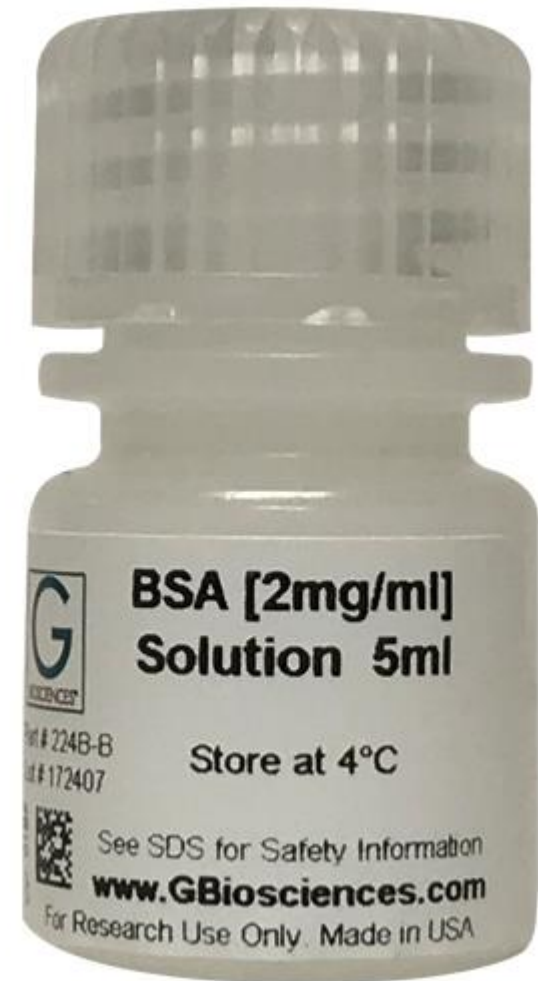
- Белки (протеины, полипептиды) — высокомолекулярные органические вещества, состоящие из альфа-аминокислот, соединённых в цепочку пептидной связью.



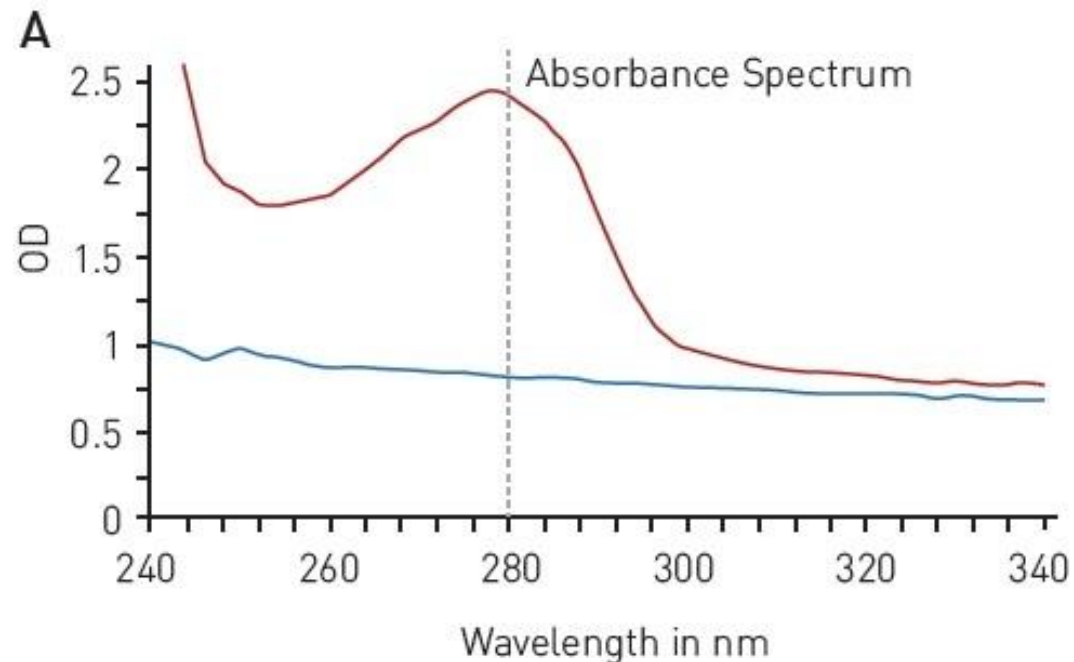
МЕТОД 1

- Белок в растворе поглощает ультрафиолетовый свет при длине волны **280 нм** благодаря присутствию в его структуре ароматических аминокислот, главным образом, **тирозина** и **триптофана**. Это свойство белков может быть использовано для их количественного определения.
- При низких концентрациях белок может адсорбироваться на стенках кюветы, что приводит к существенному заниженному результату его содержания в растворе. Во избежание этого готовят образцы с высокой концентрацией белка или используют при приготовлении неионные детергенты.

- **Испытуемый раствор.** Готовят раствор испытуемого образца в буферном растворе, указанном в частной фармакопейной статье, с концентрацией белка от 0,2 мг/мл до 2 мг/мл.
- **Раствор сравнения.** Готовят раствор соответствующего стандартного образца для определяемого белка в том же буферном растворе и с такой же концентрацией белка, что и в испытуемом растворе.



- **Методика.** При проведении испытания испытуемый раствор, раствор сравнения и компенсационный раствор выдерживают при одинаковой температуре. Определяют оптические плотности испытуемого раствора и раствора сравнения в кварцевых кюветах при длине волны 280 нм, используя указанный буферный раствор в качестве компенсационного раствора. Для получения точных результатов значения оптической плотности должны соответствовать требованиям линейности в интервале определяемых концентраций белка.



- Концентрации нуклеиновых кислот могут быть напрямую рассчитаны по их измеренным значениям оптической плотности при 260 нм с использованием уравнения Бера-Ламберта:

$$C = \frac{A}{\epsilon L}$$

• где:

- C = концентрация нуклеиновой кислоты в молях (M)
 - A = УФ-поглощение в единицах поглощения (AU)
 - ϵ = молярный коэффициент поглощения (или коэффициент экстинкции), зависящий от длины волны, в $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 - L = световой путь в см (cm)
- Этот расчет концентрации автоматизирован во многих инструментах.

- Разделив измеренную оптическую плотность раствора белка на коэффициент молярной экстинкции, вы получите молярную концентрацию раствора белка.
- Молярный коэффициент поглощения пептида или белка связан с его аминокислотным составом триптофана (W), тирозина (Y) и цистеина (C).

- The relationship between molar extinction coefficient (ϵ molar) and percent extinction coefficient ($\epsilon 1\%$) is as follows:

$$(\epsilon_{\text{molar}}) * 10 = (\epsilon 1\%) \times (\text{molecular weight of protein})$$

Example:

Assume you want to determine the $\epsilon 1\%$ for a protein whose molar extinction coefficient is $43,824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and a molecular weight of 66,400 daltons. To determine the $\epsilon 1\%$ for this protein, rearrange the above equation as follows:

$$\epsilon 1\% = (\epsilon_{\text{molar}} * 10) / (\text{MW})$$

$$\epsilon 1\% = (43,824 * 10) / (66,400 \text{ daltons})$$

$$\epsilon 1\% = 6.6$$

- To report concentrations in terms of mg/mL, an adjustment factor of 10 is used when using percent solution extinction coefficients. To convert from g/100 mL to mg/mL.

$$(A / \epsilon 1\%) * 10 = \text{concentration in mg/mL}$$

- **Задача № 2**

- Предположим, что вы получили показатель поглощения при 280 нм, равный 5,8 А, для образца белка относительно вашего эталона. Определите рассчитанную концентрацию вашего образца (мг / мл), если эталон имеет : молярный коэффициент экстинкции $43,824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и молекулярный вес 66,400 дальтон.

Ответ к Задаче № 2

- $C \text{ mg/mL} = (A / e1\%) \times 10$
- $C \text{ mg/mL} = (5.8/6.6) \times 10 \text{ C}$
- $\text{mg/mL} = 8.79 \text{ mg/mL}$

МЕТОД 2

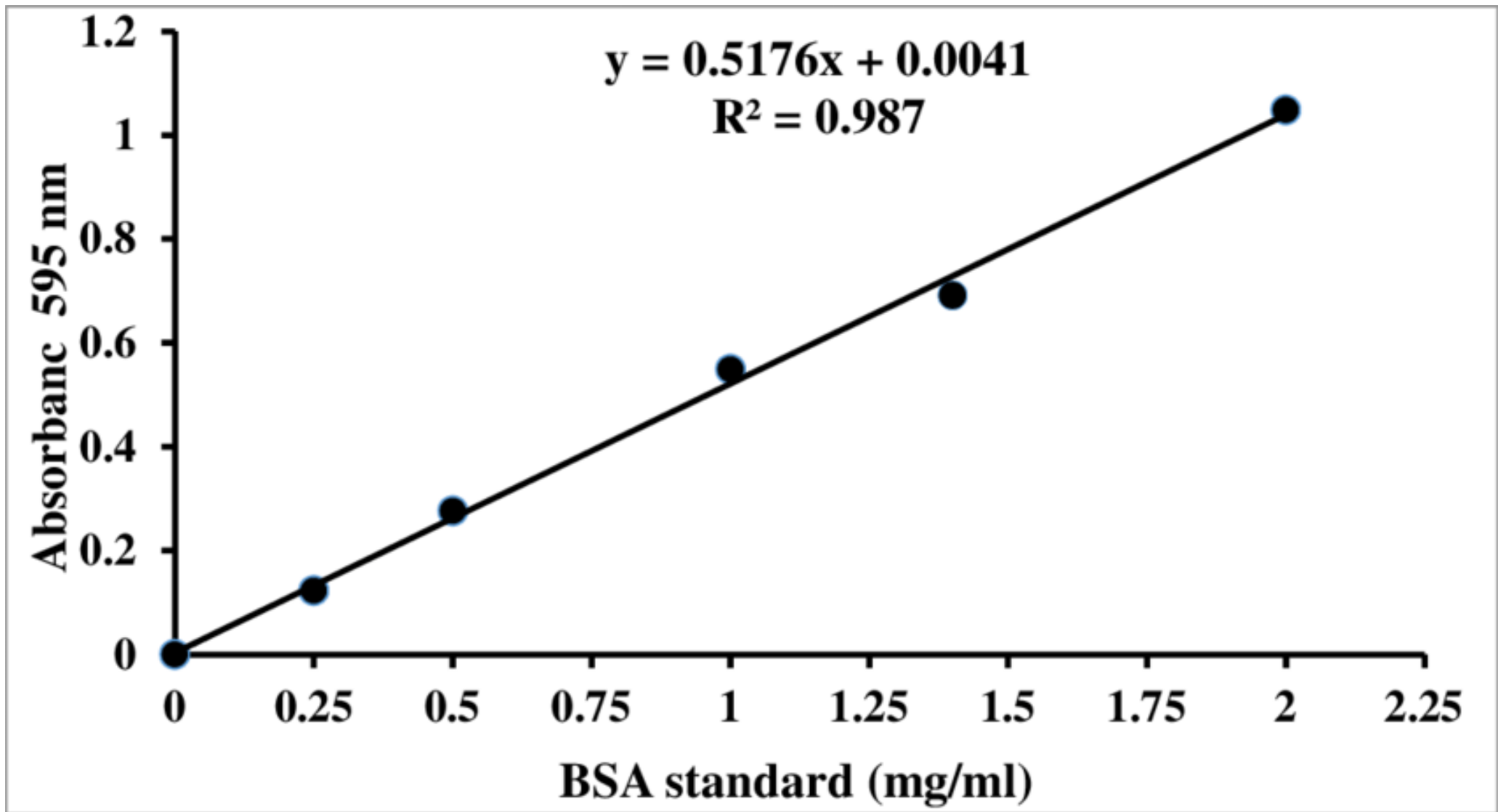
- Данный метод (обычно называемый методом количественного определения Бредфорда) основан на сдвиге максимума поглощения, обусловленного связыванием белка с красителем кислотным синим 90, от длины волны 470 нм до 595 нм. Краситель кислотный синий 90 наиболее активно связывает в белке остатки аргинина и лизина, что может приводить к погрешности при количественном определении различных белков.

- Для приготовления всех буферных растворов и реактивов, применяемых в данном методе, используют воду **дистиллированную Р.**
- **Испытуемый раствор.** Готовят раствор испытуемого образца в буферном растворе, указанном в частной фармакопейной статье, с концентрацией белка в пределах интервала концентраций калибровочной кривой.
- **Растворы сравнения.** Готовят раствор соответствующего стандартного образца белка в буферном растворе, указанном в частной фармакопейной статье. Порции полученного раствора разводят тем же буферным раствором для получения не менее пяти растворов сравнения с концентрациями белка, равномерно распределенными в интервале от 0.1 мкг/мл до 1 мкг/мл.
- **Контрольный раствор.** Буферный раствор, применяемый для приготовления испытуемого раствора и растворов сравнения.

- **Brilliant blue G250 (кислотного синего 90)**. 0,10 г *Brilliant blue G250* растворяют в 50 мл 96 % этанола Р. Прибавляют 100 мл фосфорной кислоты Р, доводят объем раствора дистиллированной водой Р до 1000 мл и перемешивают. Фильтруют раствор и хранят в контейнере из темного стекла при комнатной температуре. При хранении выпадает осадок красителя, поэтому перед использованием реактив необходимо фильтровать.

- **Методика.** К 0,100 мл каждого раствора сравнения, испытуемого раствора и контрольного раствора прибавляют по 5 мл кислотного синего 90 реактива, перемешивают переворачивая. Избегают образования пены, приводящей к ухудшению воспроизводимости. Измеряют оптические плотности растворов сравнения и испытуемого раствора при длине волны 595 нм, используя контрольный раствор в качестве компенсационного раствора. Не допускается использование кварцевых (кремниевых) спектрофотометрических кювет, вследствие связывания красителя с этими материалами.

- **Расчеты.** Зависимость оптической плотности от концентрации белка не является линейной; однако, если интервал концентраций, используемых для построения калибровочной кривой, небольшой, она приближается к линейной. Строят график зависимости оптических плотностей растворов сравнения от концентраций белка и, используя линейную регрессию, строят калибровочную кривую. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.



Для калибровочной кривой использовали 2 мл 1х реагента Брадфорда и 10 мкл контрольного белка BSA

Задача № 3

- Используя вышеприведённую формулу рассчитайте количество белка в 1 мл клеточного экстракта, если известно, что реакция ставилась в 2 мл 1х раствора Брэдфорда и белка использовалось 20 мкл на реакцию. В результате были получены значения:
- №1 образец ($A_{595} = 0,111$)
- №2 образец ($A_{595} = 0,445$)

Ответ к Задаче № 3

- №1 образец ($A_{595} = 0,111$) = 0,103 мг\мл
- №2 образец ($A_{595} = 0,445$) = 0,426 мг\мл

ЛИТЕРАТУРА

1. http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm
2. Щелкунов С.Н. «Генетическая инженерия», Учебно-справочное пособие. 3-е изд. Новосибирск: СУИ, 2008 – 514 с
3. Жимулев И.Ф. «Общая и молекулярная генетика» учебное пособие. Новосибирск: СУИ, 2007.
4. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, NY.
5. Маниатис Т., Фрих Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984.
6. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
7. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
8. Brown T.A. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 7th edition. Wiley-Blackwell, 2016.
9. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. Molecular Cell Biology. 9th edition. W.H. Freeman, 2021.
10. Ausubel F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 2002.