

---

**Название работы**

Спектрофотометрическое определение нативности и концентрации ДНК в водном растворе

Бойцова Наталья Андреевна, ГБОУ лицей 344, 11 “А”  
Научный руководитель: инженер-исследователь каф.  
МБиФП физического ф-та СПбГУ Тымченко Екатерина  
Евгеньевна

Эта работа посвящена изучению метода Спирина в теории и на практике.  
Во время её создания были проведены реальные эксперименты.

Санкт-Петербург  
2020 г.

---

## Содержание:

1. Введение.....	3
2. Цель работы: Освоить метод УФ-спектрометрии и узнать о практическом применении закона Бугера-Ламбера-Бера .....	3
3. Задачи:.....	3
4. Литобзор.....	4
4.1. <i>Объект исследования - ДНК</i> .....	4
4.2. <i>Методы</i> .....	5
4.2.1. Закон Бугера-Ламберта-Бера .....	5
4.2.2. Оптическая прозрачность по определению.....	5
4.2.3. Денатурация.....	5
4.2.4. Закон Бугера-Ламберта-Бера в логарифмическом виде .....	6
4.2.5. УФ спектрофотометр .....	6
4.2.6. Метод Спирина .....	7
5. <i>Ход работы</i> .....	7
5.1. <i>Материалы и методы</i> .....	7
5.2. <i>Ход работы</i> .....	7
5.3. <i>Таблица 1 Результаты измерений</i> .....	9
6. <i>Результаты</i> .....	10
7. <i>Вывод</i> .....	10
8. <i>Список использованной литературы</i> .....	10

---

## 1. Введение

Метод Спирина, предложенный им в 1958, был опубликован в журнале “Биохимия” и оказался поистине революционным. С помощью относительно простых действий и точных весов можно было с очень высокой точностью определить концентрацию и нативность ДНК в растворе. До сих пор ученые всего мира используют этот метод в своих исследованиях, помогающих нам лучше понять мир. Ведь без точных знаний о степени натуральности ДНК невозможно изучать ее строение и свойства, могущие пролить свет на происхождение и возможное лечение многих болезней, на клонирование клеток и на другие передовые отрасли науки.

## 2. Цель работы:

Освоить метод УФ-спектрометрии и узнать о практическом применении закона Бугера-Ламбера-Бера.

## 3. Задачи:

1. Приготовление раствора ДНК из лиофилизованной натриевой соли
2. Приготовление проб для УФ - спектрометрии по методу Спирина
3. Снятие показаний УФ – спектрометра
4. Обработка данных в Excel
5. Расчет концентрации нативной ДНК и коэффициента экстинкции
6. Определение примесей белка и РНК

## 4. Литобзор

### 4.1. Объект исследования - ДНК

Объектом нашего исследования было ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота)

ДНК – молекула, содержащаяся в ядре клетки и хранящая информацию о наследовании.

Её функции: сохранение наследственной информации, её передача и реализация.

Молекула ДНК обычно состоит из двух цепей, закрученных друг относительно друга по винтовой линии (часто говорят «спирально закрученных») и соединенных между собой водородными связями.

Каждый нуклеотид ДНК состоит из

- 1) азотистого основания,
- 2) сахара - дезоксирибозы,
- 3) остатка фосфорной кислоты

В состав ДНК входят следующие азотистые основания: аденин, гуанин, тимин и цитозин. Аденин и гуанин относятся к пуринам, а тимин и цитозин — к пиримидинам

Азотистые основания одной цепи молекулы ДНК соединяются с азотистыми основаниями другой строго по принципу комплементарности: аденин только с тимином (образуют между собой две водородные связи), а гуанин только с цитозином (три связи).

Исследованные ДНК имели В-форму ДНК — одно из трех основных конформационных состояний двухцепочечной молекулы (А, В- и Z-ДНК), в которой 2 нити спирали образуют правозакрученную спиральную структуру

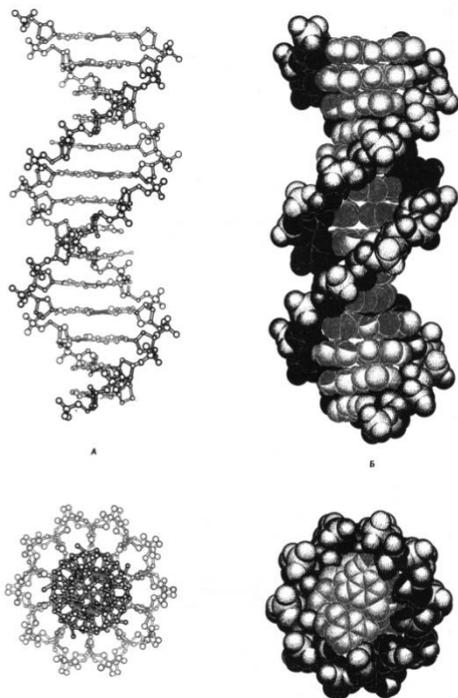


Рис.1 Структура В-формы ДНК, построенная по координатам всех атомов. Приведен вид сбоку и сверху. А - скелетная модель; Б – объемная модель.[ 4]

В данном исследовании мы определяли концентрацию нативной ДНК — природной двухцепочечной молекулы с ненарушенными водородными связями между всеми комплементарными парами оснований двух цепей, находящийся в биологически активной форме.

Такая ДНК существует только в животной клетке. Степень нативности ДНК, полученной в лаборатории, указывается в паспорте.

## 4.2. Методы

### 4.2.1. Закон Бугера-Ламберта-Бера

Закон Бугера-Ламберта-Бера — физический закон, определяющий ослабление параллельного монохроматического пучка света при распространении его в поглощающей среде.

Закон выражается следующей формулой:

$$I_1 = I_0 \cdot e^{-k \cdot l}$$

где  $I_0$  — интенсивность входящего пучка, эрг/с\*см<sup>2</sup>

$l$  — толщина слоя вещества, через которое проходит свет, см

$k$  — показатель поглощения - коэффициент, характеризующий свойства вещества и зависящий от длины волны  $\lambda$  поглощаемого света. Эта зависимость называется спектром поглощения вещества. см<sup>-1</sup>

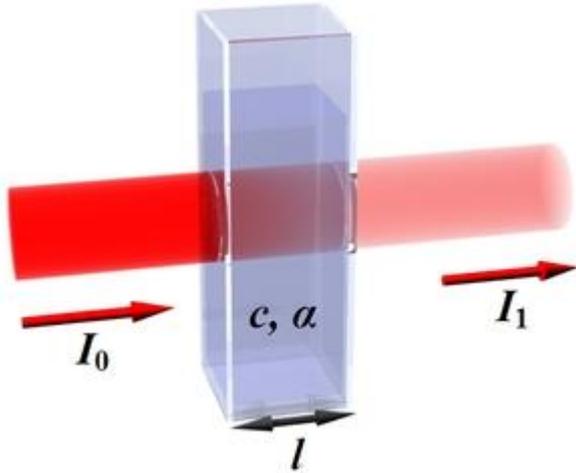


Рис.2 Иллюстрация к закону Бугера-Ламберта-Бера

### 4.2.2. Оптическая прозрачность по определению

$$D = -\lg(I_0/I_1)$$

где  $I_0$  - интенсивность падающего света;  $I_1$  - интенсивность света после прохождения слоя вещества толщины  $l$

В исследовании мы ожидаем получить  $D$  примерно в 0.5, так как при  $D=1$  всего 10% света проходит через образец

### 4.2.3. Денатурация

Денатурация нуклеиновых кислот — явление разрушения нативной структуры нуклеиновых кислот под действием химических и физико-химических факторов. Так как при денатурации нуклеиновых кислот их первичная структура сохраняется, то данный процесс может иметь обратимый характер.

#### 4.2.4. Закон Бугера-Ламберта-Бера в логарифмическом виде

$$D = E \cdot I \cdot C$$

D – оптическая проницаемость,

E – коэффициент экстинкции, характеризующий взаимодействие молекулы поглощающего вещества со светом длины волны  $\lambda$ , л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>

C — концентрация растворённого вещества, моль/л

L – оптический путь, см

E<sub>нативной ДНК</sub> = 6 500 л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>

E<sub>денатурировавшей ДНК</sub> = 10 000 л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>

#### 4.2.5. УФ спектрофотометр

Спектрофотометры позволяют разлагать белый свет в непрерывный спектр, выделять из этого спектра узкий интервал длин волн, в пределах которого световой пучок можно считать монохроматическим, пропускать изолированный пучок света через анализируемый раствор и измерять с высокой степенью точности интенсивность этого пучка. В фотометрическом спектрофотометре сочетаются два основных прибора: монохроматор, служащий для получения монохроматического светового потока, и фотоэлектрический фотометр, предназначенный для измерения интенсивности света.

Монохроматор состоит из трех основных частей: источника света, диспергирующего устройства (устройства, разлагающего белый свет в спектр) и приспособления, регулирующего величину интервала длин волн светового пучка, падающего на раствор.

Для разложения света в спектр применяются стеклянные и кварцевые призмы, а также дифракционные решетки. Очень важной деталью спектрофотометра является щель, с помощью которой можно регулировать интенсивность светового потока.

В основу работы спектрофотометра положен принцип измерения отношения двух световых потоков: потока, прошедшего через исследуемый образец, и потока, падающего на исследуемый образец (или прошедшего через контрольный образец).

Световой пучок из осветителя попадает в монохроматор через входную щель и разлагается дифракционной решеткой в спектр. В монохроматический поток излучения, поступающий из выходной щели в кюветное отделение, поочередно вводятся контрольный и исследуемый образцы. Излучение, прошедшее через образец, попадает на катод фотоэлемента в приемно-усилительном блоке. Электрический ток, проходящий через резистор RН, который включен в анодную цепь фотоэлемента, создает на резисторе падение напряжения, пропорциональное потоку излучения, падающему на фотокатод.

После измерения прибор рассчитывает оптическую проницаемость D исследуемого образца. Значение измеренной величины высвечивается на табло.

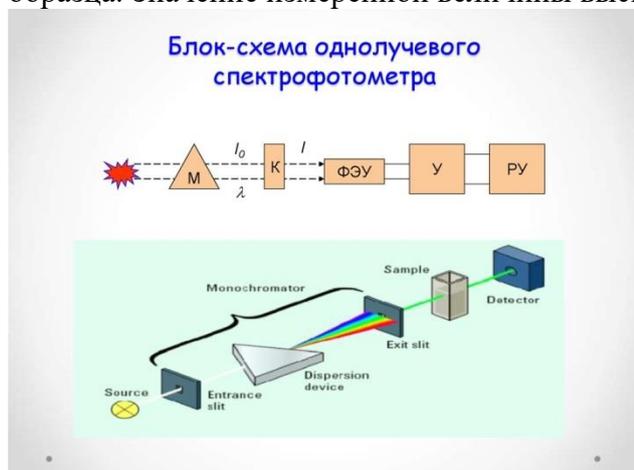


Рис.3 Схема однолучевого спектрофотометра [2]

#### 4.2.6. Метод Спирина

Метод Спирина основан на том, что коэффициент экстинкции в нативной ДНК и полностью денатурировавшей известны, а так же с помощью спектофотометра возможно точно определить оптическую проницаемость исследуемой ДНК и полностью денатурировавшей на разных длинах волн. Зная, что  $E_{\text{денатурировавшей ДНК}} = 10000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , мы можем найти концентрацию и также  $E_{\text{нативной ДНК}}$ , пользуясь законом Бугера-Ламберта-Бера и формулами.

Плюсы этого метода

1. Использование разности  $E_{270} - E_{290}$  имеет то преимущество, что эта величина примерно одинакова и для ДНК, и для РНК. Это позволяет вести их суммарное определение независимо от количественных соотношений этих кислот в материале.
2. Снижается влияние белковых примесей, так как они имеют примерно одинаковые поглощения при 270 и 290 нм, что приводит к их взаимному вычитанию.
3. Кроме того, известно, что хлорная кислота является осадителем белков, и таким образом дает безбелковые экстракты.

### 5. Ход работы

#### 5.1. Материалы и методы

В работе использовались:

- лиофилизованная натриевая соль ДНК тимуса теленка (фирма производства - Worthington);
- NaCl хч (Реахим);
- HClO<sub>4</sub> 65% хч (Реахим);
- H<sub>2</sub>O(SQ), предоставленная для работы РЦ «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» НП СПбГУ;

Измерения проводились на УФ-спектрометре на длинах волн [230, 260, 270, 280, 290, 320] в кварцевой кювете с оптическим путем 1 см.

Материалы: ДНК, NaCl, HCl, H<sub>2</sub>O(SQ)

Методы: УФ-спектрометр

Кюветы 1 см кварц

#### 5.2. Ход работы

##### I этап. Получение раствора NaCl с известной концентрацией

Для получения такого раствора мы воспользовались тем, что в насыщенном растворе невозможно растворить вещества больше некой критической массы – оно будет выпадать в осадок, соответственно, мы будем знать точную концентрацию раствора, из которого будем готовить промежуточные

1.) Для измерения массы NaCl воспользовались электронными весами, не забыв учесть массу тары

$$m(\text{NaCl}) \approx 40 \text{ г}$$

2.) Для измерения объема воды воспользуемся мерным стаканчиком

$$V(\text{H}_2\text{O}(\text{SQ})) \approx 100 \text{ мл}$$

$C(\text{NaCl})=0.4 \text{ г/мл}$

3.) Смешаем NaCl и H<sub>2</sub>O(SQ) и поставим на магнитную мешалку, принцип действия который основан на магните, помещенном в раствор и приборе, создающем магнитное поле  
Ионная сила

$$\mu(\text{NaCl}) = \frac{1}{2} ([\text{Na}]Z_{\text{Na}}^2 + [\text{Cl}]Z_{\text{Cl}}^2) = 0.005 \text{ M}$$

### II этап. Получение водного раствора ДНК

Для этого раствора используем ДНК Мы не готовим насыщенный раствор из-за того, что молекулы ДНК гигроскопичны, то есть способны поглощать влагу из воздуха;

происходит неполное растворение препарата и осаждение не растворившейся части навески при очистке (осветлении) раствора центрифугированием; происходит частичное осаждение даже растворившегося материала при специальной очистке раствора длительным центрифугированием

1.) Достали из морозильника лиофилизованную натриевую соль ДНК в виде сухих нитей бежево-белого цвета

2.) С помощью спирта обработали пинцет и лоток

3.) С помощью электронных весов и лотка, не забыв обнулить тару, отмерили массу ДНК

$m(\text{ДНК}) = 110,6 \text{ мг}$

4.) С помощью мерного стакана отмерили нужный объем воды и добавили к ДНК

$V(\text{H}_2\text{O}(\text{SQ})) \approx 40 \text{ мл}$

5.) Расчетная концентрация по навеске составила 2,765 мг/мл

### III этап. Добавление раствора NaCl в раствор ДНК

Это необходимый шаг, так как молекулы воды, проникая между частями ДНК внутри спирали,

способны своим диполем разрушать водородные связи, как бы отталкивая нити ДНК друг от друга. Гидрофильно-гидрофобные взаимодействия обосновывают вторичную структуру ДНК (двойная спираль, снаружи находится отрицательно заряженный сахаро-фосфатный остов, а внутри – неполярные азотистые основания)., Ионы NaCl экранируют молекулу ДНК от воздействия воды.

### IV этап. Приготовление 6% HClO<sub>4</sub>

Расчет массы воды, необходимой для того, чтобы превратить 65% раствор кислоты в 6 %, так как конечный объем 1.2 мл, то нам необходимо взять 0,115 мл кислоты и добавить 1.085 мл воды

### V этап. Получение промежуточного стока раствора ДНК

Для метода Спирина нам примерно  $D=0,5$

Зная, что  $E$  денатурировавшей ДНК =  $10000 \text{ см}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{моль}^{-1}$ ,

а  $l=1 \text{ см}$ , то, по закону Бугера-Ламберта-Бера,  $C=0,00005 \text{ моль/л}$ , так как  $M(\text{п.о.})=660 \text{ г/моль}$ , то  $C=33 \text{ мкг/мл}$ . У нас 4 пробирки по 1,5 мл, то нам необходима  $m=4 \cdot 1,5 \text{ мл} \cdot 33 \text{ мкг/мл} \approx 200 \text{ мкг}$

Так как  $C_{\text{навески}} \approx 2,5 \text{ мг/мл}$ , то нам необходимо взять  $V=0,08 \text{ мл}$ , то есть нам необходимо 0,92 мл H<sub>2</sub>O(sq), чтобы получился ровно 1 мл. Разливаем на 4 пробы

### VI этап. Создание проб для метода Спирина

1. Взвешиваем каждую пробирки по отдельности ( $m_0$ )

2. В пробирки n, 1,2,3, доливаем раствор ДНК ( $m \text{ ДНК}$ ) по 0,25 мл каждый

3. Взвешиваем пробирки

4. В пробирку n добавляем воду (m H2O)
5. В пробирки 1, 2, 3, добавляем 6% HClO<sub>4</sub> (mHClO<sub>4</sub>)
6. Взвешиваем пробирки
7. Пробирки 1, 2, 3 кипятим на водяной бане, чтобы водородные связи в ДНК распались, а затем охлаждаем на льду, для того, чтобы предотвратить ренатурацию (восстановление водородных связей)
8. Взвешиваем пробирку и наливаем в неё H<sub>2</sub>O(sq), которой пользовались в работе
9. С помощью Уф спектрометра определяем D на указанных длинах волн
10. Все результаты приведены в таблице 1, погрешность рассчитана по Стьюденту с доверительной вероятностью 0,95
11. С помощью УФ спектрометра определяем D на указанных длинах волн для растворителя H<sub>2</sub>O SQ kip
12. Результаты этих измерений приведены в таблице 2

Формулы, необходимые для вычислений

$$C = \frac{(D_{270} - D_{290}) * 10,1 * V_{\text{кон}}}{0,19 * V_{\text{нач}}}$$

$$E = \frac{31 * D_{260} * V_{\text{кон}}}{0,099 * C * V_{\text{нач}}}$$

$$K1 = \frac{D_{230} \text{ нативной ДНК} - D_{230} \text{ растворителя}}{D_{260} \text{ нативной ДНК} - D_{260} \text{ растворителя}}$$

$$K2 = \frac{D_{260} \text{ нативной ДНК} - D_{260} \text{ растворителя}}{D_{280} \text{ нативной ДНК} - D_{280} \text{ растворителя}}$$

Где K<sub>1</sub> и K<sub>2</sub> - коэффициенты для определения примесей РНК и белков, сравниваются с табличными значениями

Формулы и ход работы взяты из пунктов 1 и 6 использованной литературы

### 5.3. Таблица 1 Результаты измерений

	Нативная ДНК	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Абсолютная погрешность по Стьюденту	HClO <sub>4</sub>
масса пробирки, г	0.9884	0.9942	0.9849	0.9855	0.0067	
масса пробирки с ДНК, г	1.2332	1.2013	1.2388	1.2393	0.0605	
масса пробирки с ДНК с H <sub>2</sub> O(SQ), г	2.49	1.2013	1.2388	1.2393		
масса пробирки ДНК с HClO <sub>4</sub> , г	2.49	2.5335	2.788	2.566	0.344	
Мк, г	2.49	2.5335	2.788	2.566		
D <sub>230</sub>	303	390	398	433	57	138
D <sub>260</sub>	543	650	670	761	146	97
D <sub>270</sub>	454	654	675	771	154	87
D <sub>280</sub>	314	502	519	590	115	78
D <sub>290</sub>	158	281	292	329	62	71
D <sub>320</sub>	44	56	58	57	2	54

$E_{260}=6724.294$

$C$  (ммоль/мл)=1.92157

### 5.3. Таблица 2. Результаты измерений для растворителя

растворитель	H2O SQ kip
D230	97
D260	56
D270	52
D280	49
D290	47
D320	41

$K_1=2.4$

$K_2=1.9$

## 6. Результаты

В ходе работы мы

1. Научились готовить растворы

2. Приобрели навыки по работе с лабораторным оборудованием

3. Получили значения молярной концентрации и коэффициента экстинкции

$E_{260} = 6700 \text{ л*моль}^{-1} \text{ см}^{-1} \pm 2000 \text{ л*моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$

$C = 1.9 \pm 0,6$  ммоль/мл

4.  $E$  нативной ДНК=6500 л\*моль<sup>-1</sup>\*см<sup>-1</sup>, т.е наша ДНК имеет высокую степень нативности ( $E=67000 \text{ л*моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ )

5. По соотношению результатов измерения на длинах волн 260 на 230, 260 на 270 можно сделать вывод о том, что примеси РНК и белков в пределах погрешности не выявлено

$K_1=2.4 \pm 0,1$

$K_2=1.9 \pm 0,1$

## 7. Вывод

Метод Спирина позволяет с высокой точностью узнать значения молярной концентрации и коэффициента экстинкции ДНК, которые можно использовать в последующих экспериментах.

## 8. Список использованной литературы

1. Спирин А.С. (1958) "Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот". Биохимия, 23(5), С. 656-662
2. Светлов А.А., Карлова О.В., Дьяконова А.Н., Дюба А.В. (2013) "Молекулярная биология клетки", НИИЦ "Регулярная и хаотическая динамика"
3. Сибилева М.А., Морощкина Е.Б. (2006) "Руководство к лабораторному практикуму по молекулярной биофизике" Санкт-Петербургский государственный университет Физический факультет, Санкт-Петербург
4. Конев С.В., Волотовский И.Д. (1979) "Фотобиология", Издательство БГУ им. В.И.Ленина, Минск
5. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. (1994) "Молекулярная биология клетки", "Мир", Москва
6. Glasel J.A. (1995) "Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by 260nm/280nm Absorbance Ratios", BioTechniques Vol. 18 №1, С. 62-63