

Institutt for fysikk, Gruppe for biofysikk
Fil: \01\mbl_abs.tex 21. okt. 2001

Sted: Rom B4-114 Realfagbygget.

ABSORPSJONSSPEKTROSKOPI

Opgavens formål:

- Bli kjent med prinsippene for et diodearray-spektrofotometer.
- Kartlegge absorpsjonsspekteret for ulike biomolekyler: aminosyre, protein, polysakkarid og DNA.
- Bestemme ekstingsjonskoeffisientene $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280nm) for ulike biomolekyler og bestemme konsentrasjonen til ulike løsninger av albumin.

1 Teori

Et moderne spektrofotometer kan måle absorpsjonen i løsninger i bølgelengdeområdet fra 200 nm (UV) til 1000 nm (infrarødt). Bølgelengder kortere enn ca. 180 nm absorberes så sterkt i luft at for eventuell måling i dette området måtte hele spektrofotometerets lysveg befinne seg i vakuum. Dessuten absorberer vann (det vanligste løsningsmidlet) sterkt under 195 nm.

Den mest vanlige bruken av et spektrofotometer er å bestemme konsentrasjonen i ukjente prøver. Da brukes en absorpsjonstopp innenfor det angitte bølgelengdeområdet. En annen bruk er å sammenlikne absorpsjonsspekteret med et kjent spekter for å kartlegge reinheten til prøven.

De fleste molekyler har sterk UV-absorpsjon for bølgelengder kortere enn ca. 220-230 nm pga. eksitasjon av elektronorbitaler i kovalente bindinger, men dette bølgelengdeområdet er på yttergrensen av hva et vanlig spektrofotometer kan detektere pålitelig. **De aromatiske aminosyrene** har et markert absorpsjonsmaksimum nær 280 nm. Proteiner som inneholder disse aminosyrene har derfor sterk absorpsjon ved 280 nm og målinger kan derfor brukes til å bestemme konsentrasjonen av protein i løsninger. **DNA og RNA** har en markert absorpsjonstopp nær 265 nm, mens **polysakkarider** har normalt ingen tydelig absorpsjonstopp i spektrofotometerets bølgelengdeområde og vi kan derfor ikke bruke denne metoden til å bestemme polysakkaridkonsentrasjoner.

1.1 Beer-Lamberts lov

Absorpsjon av lys i en løsning beskrives av Beer-Lamberts lov, slik den er forklart i kompendiet i Molekylær biofysikk:

$$\text{OD} \equiv \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = A(\lambda) c \ell \quad (1)$$

der

- OD = optisk tetthet (Optical Density)
- I_0 = intensitet inn mot løsningen,
- I = intensitet ut av løsningen
- $A(\lambda)$ = den molare ekstingsjonskoeffisienten, med enhet $(\text{cm} \cdot \text{M})^{-1}$
- c = konsentrasjon av makromolekyl i løsningen, enhet mol/l = M
- ℓ = lyslengde gjennom løsningen i cm.

Med spektrofotometeret innstilt på absorpsjonsmåling får vi avlest OD direkte. Som et spesifikt mål for absorpsjonen oppgis ekstingsjonskoeffisienten $A_{1\%}^{1\text{cm}}(\lambda)$, definert slik:

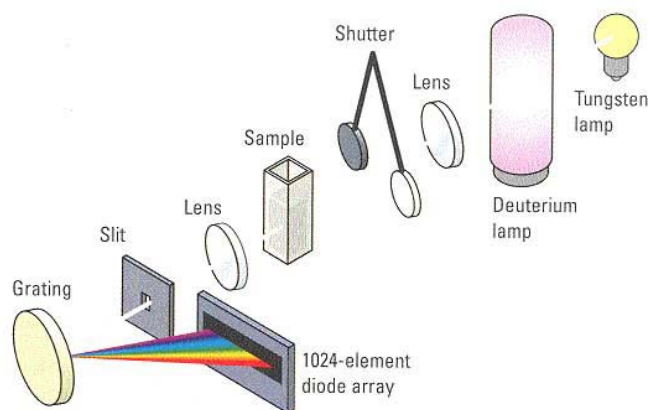
$$A_{1\%}^{1\text{cm}}(\lambda) = \text{OD ved bølgelengde } \lambda \text{ for } 1\% \text{ (10 mg/ml) løsning i en kuvette med } \ell = 1 \text{ cm lysveg.}$$

Fra målte verdier av OD på en prøve med konsentrasjon c beregner vi ekstingsjonskoeffisienten slik:

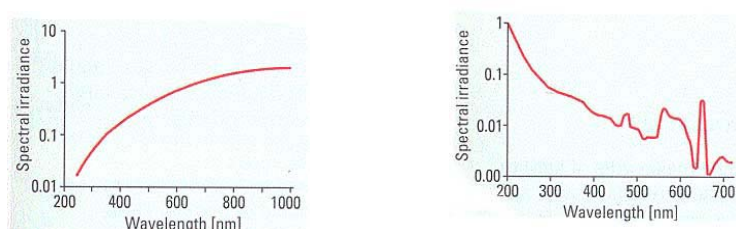
$$A_{1\%}^{1\text{cm}}(\lambda) = \text{OD} \cdot \frac{1}{\text{kons.i}\%} = \text{OD} \cdot \frac{10 \text{ mg/ml}}{c \text{ (i mg/ml)}} \quad (2)$$

Sammenhengen mellom den molare $A(\lambda)$ og $A_{1\%}^{1\text{cm}}(\lambda)$:

$$A(\lambda) = \frac{A_{1\%}^{1\text{cm}}(\lambda)}{10} \cdot M_W \quad (3)$$



Figur 1: Skjematisk skisse av Agilent 8453 diode-array-spektrofotometer.



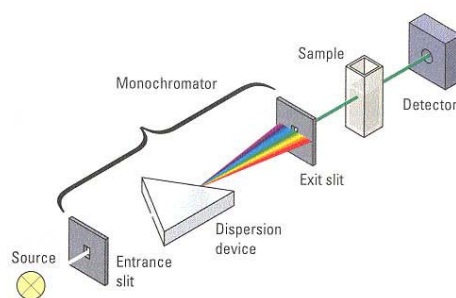
Figur 2: Emisjonsspekteret for en glødelampe (til venstre) og deuterium-lampe (UV-lampe) (til høyre).

2 Spektrofotometeret

Spektrofotometeret som brukes i denne oppgaven er et Agilent HP 8453 UV-Visible spektrofotometer (nytt høsten 2000). En prinsippsskisse av dette er vist i Fig. 1. Spektrofotometeret består av fire fysiske deler:

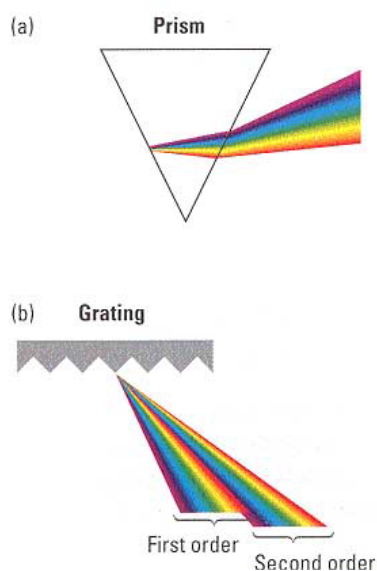
- *Lyskilde*, en boks med:
Deuteriumlampe (UV-lampe) som gir intensitet i området $\lambda = 185 - 350$ nm, og Wolframlampe (glødelampe) som gir intensitet i området $\lambda = 300 - 2500$ nm. (Se Fig. 2 for lampenes spektralkurver.) Boksen inneholder også AV/PÅ-knapp for instrumentet.
- *Kuvetteholder*:
En enkel kuvetteholder med plass for en kuvette om gangen. Kuvetten står i åpent dagslys (smale lysspalter skjermer av for utvendig lys).
- *Lysdetektor*:
En boks med gitter (monokromator) og diodearray samt noen funksjonsknapper. (Funksjonsknappene nåes fra dataprogrammet).
- En datamaskin med programvare som styrer instrumentet og tar imot måleresultater.

Med en diodearray-detektor er lyset gjennom prøven hvitt (dvs. alle spektralfarger) og gitteret er plassert etter prøven. Lysdetektoren består en rekke (array) av 1024 lysdioder som gir en oppløsning på ca. en nanometer. Slik kan intensiteten for alle bølglengder detekteres i en og samme måling. For spektrofotometre som ikke har diode-array mottar lysdetektoren signal fra et



Figur 3: Skjematisk skisse av et konvensjonelt spektrofotometer.

smalt bølglengdeområde om gangen. (Se Fig. 3). Dersom hele spekteret skal måles må monokromatoren mekanisk roteres slik at alle aktuelle bølglengder i tur og orden treffer detektoren.



Figur 4. Skjematisk skisse av oppsplitting av lysets spektralfarger med a) prisme og b) gitter.

Som monokromator kan et prisme eller et gitter brukes (Fig. 4). I diodearray-spektrofotometeret brukes et reflekterende gitter, som gir oppsplitting av de ulike bølglengder ifølge Braggvilkåret $\sin \alpha = \lambda/D$, der D er gitteravstanden. Spekteret fra første ordens refleks sendes inn på diodearrayet.

Signalet fra diode-arrayet går via et datakort i spektrofotometeret til en PC. Programvare i PCen sørger for at det fulle spekteret vises på skjermen. OD for hver λ i nanometer kan også vises i en tabell, eller OD for utvalgte bølglengder. I tillegg kan spekteret matematisk manipuleres ved å subtrahere, derivere etc., men dette skal vi ikke bruke i denne laboppgaven.

Til målinger i UV-området må en bruke kvartskuvetter, disse er merket "QS" eller "UV". Glasskuvetter er merket "OS" eller "VISIBLE" og absorberer UV-stråler meget sterkt. I første del av oppgaven skal vi få demonstrert dette. Kvartskuvettene koster over 1000 kr/stk og et fall i gulvet kan derfor bli dyrt.

Fordi to kuvetter kan ha ulike absorpsjonsforløp må det brukes en og samme kuvette for henholdsvis buffer ("blank") og prøve ("sample"). Dataprogrammet trekker fra måleverdiene for blank og viser netto absorpsjon for prøven. Mellom hver prøve som fylles i kuvetta må den gjøres helt rein og tørr innvendig. Dette gjøres med en spesiell kuvettevasker der vi spylers med vann, etanol og eter i den gitte rekkefølgen.

Det er viktig å være reinslig når man jobber med et spektrofotometer. Refleksjonen ved kuvetteveggene er svært følsom for urenheter og er alltid større enn 4% (refleksjon reint glass/luft er 4%). Ved å dampe på en Mg_2FCl antireflekshinne kan denne refleksjonen reduseres. Tykkelsen på hinnen er av størrelsesorden lik λ slik at vi får destruktiv interferens for det reflekterte lyset.

3 Prøver til denne oppgaven

Prøvene er ferdiglaget ved innveing fra reine, kommersielle preparat. Hemoglobin kan vi også få fra hemolysat fra røde blodceller, men det kreves en del arbeid for å få prøven rein. Tabellen viser de ulike løsningene som skal brukes i oppgaven.

Molekyl	M_W /Dalton
a) Skleroglukan	$3,5 \cdot 10^6$
b) Tryptofan	204,2
c) Tyrosin	181,2
d) Glutaminsyre	147,1
e) Bovin albumin	66300
f) Hemoglobin	68000
g) DNA	?

4 Tabellverdier

Ekstingsjonskoeffisient for aminosyrer og albumin ved $\lambda = 280$ nm.

(fra Handbook of Biochemistry & Molecular Biology, Vol I, 3rd Ed)

Protein	M_W /Dalton	$A(\lambda) \equiv \epsilon(\lambda)$	$A_{1\%}^{1\text{cm}}(\lambda) = \frac{10 \cdot A(\lambda)}{M_W}$
Tyrosin	181,2	1197 ± 0	66,06
Tryptofan	204,2	5559 ± 12	$272,2 \pm 0,60$
Glutaminsyre	147,1	0,0	0,00
Bovin albumin	66300	?	6,60

Ekstingsjonskoeffisient for hemoglobin (fra humant blod, ved pH7).

(fra Handbook of Biochem. & Mol.Biol. Vol II, 3rd Ed, p.445)

$\frac{\lambda}{\text{nm}}$	$A_{1\%}^{1\text{cm}}$
270	25,8
280	23,3
290	18,8
541	9,6
576	10,2

5 Oppgave

Veileder starter opp og instruerer i bruk av spektrofotometeret og det tilhørende dataprogram.

- Mål absorpsjonsspekteret for en glasskuvette og en kvartskuvette fylt med buffer. Velg "Spectrum/Peaks" under "Task" i programvinduet. Bruk luft (dvs. ingen kuvette) som blank. Sammenlign absorpsjonen i glasskuvetta med absorpsjonen i kvartskuvetta. Hvilken kuvette vil du bruke i de følgende målinger?
- Mål absorpsjonsspekteret for de utleverte prøvene i området 200 nm - 600 nm. Husk først å nulle ut ved å ha kuvette med buffer som "blank".
- Beregn $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 nm) for alle prøvene. Sammenlikn dine verdier med verdiene gitt for $\lambda = 280$ nm i tabellen.
- Velg så "Quantification" i programmet.
- Lag en kalibreringskurve ved å bruke buffer som blank og følgende to standarder:
i) 1,0 mg/ml albumin og ii) 2,0 mg/ml albumin.
Beregn fra standardene $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 nm) og sammenlikn med oppgitte data i tabellen.
- Mål OD ved 280 nm for de tre ukjente prøvene av albumin og se hvilken konsentrasjon programmet beregner for hver av dem. Beregn også konsentrasjonen fra målt OD og beregnet $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 nm) i punktet over.
- Kommenter resultatene, spesielt med henblikk på eventuelle særegne absorpsjonstopper.
- Skriv opp formlene for de 3 aminosyrene.
- Rapporten skal inneholde data fra målingene, svar på spørsmål