

Usando el NanoDrop One para cuantificar Proteínas y Péptidos a 205 nm

Editorial Article: Application: Using the NanoDrop One to Quantify Protein and Peptide Preparations at 205nm

by Sean Loughrey, Jessica Mannion and Brian Matlock, Thermo Fisher Scientific

Resumen

Los investigadores en ciencias de la vida siempre han necesitado formas de cuantificar rápidamente diversas biomoléculas (por ejemplo, proteínas y preparaciones de ácido nucleico) como una parte rutinaria de sus flujos de trabajo. Esta información ayuda a tomar decisiones informadas antes de continuar con los experimentos posteriores. Hay muchos métodos de cuantificación de proteínas para elegir, incluyendo enfoques gravimétricos y ensayos colorimétricos, las mediciones directas de UV espectrofotométricas y análisis de aminoácidos. Todos estos métodos tienen sus puntos fuertes y débiles. Las mediciones espectrofotométricas UV directas son una opción de amplio uso ya que son fáciles de realizar, no requieren reactivos o normas, y consumen muy poca muestra. El NanoDrop One tiene aplicaciones pre-programados (Figura 2a) para la cuantificación directa de proteínas utilizando medidas de absorbancia a 280 nm y 205 nm.

Este artículo describe específicamente cómo utilizar la aplicación **Protein A205** para cuantificar muestras de proteínas. El método de proteínas A205 tiene algunas ventajas sobre el método directo A280. Tales ventajas incluyen **menor variabilidad** (porque los coeficientes de extinción A205 no se basan en la composición aminoacídica) y **más sensibilidad** (debido a la alta absorptividad molar de las proteínas a 205 nm).

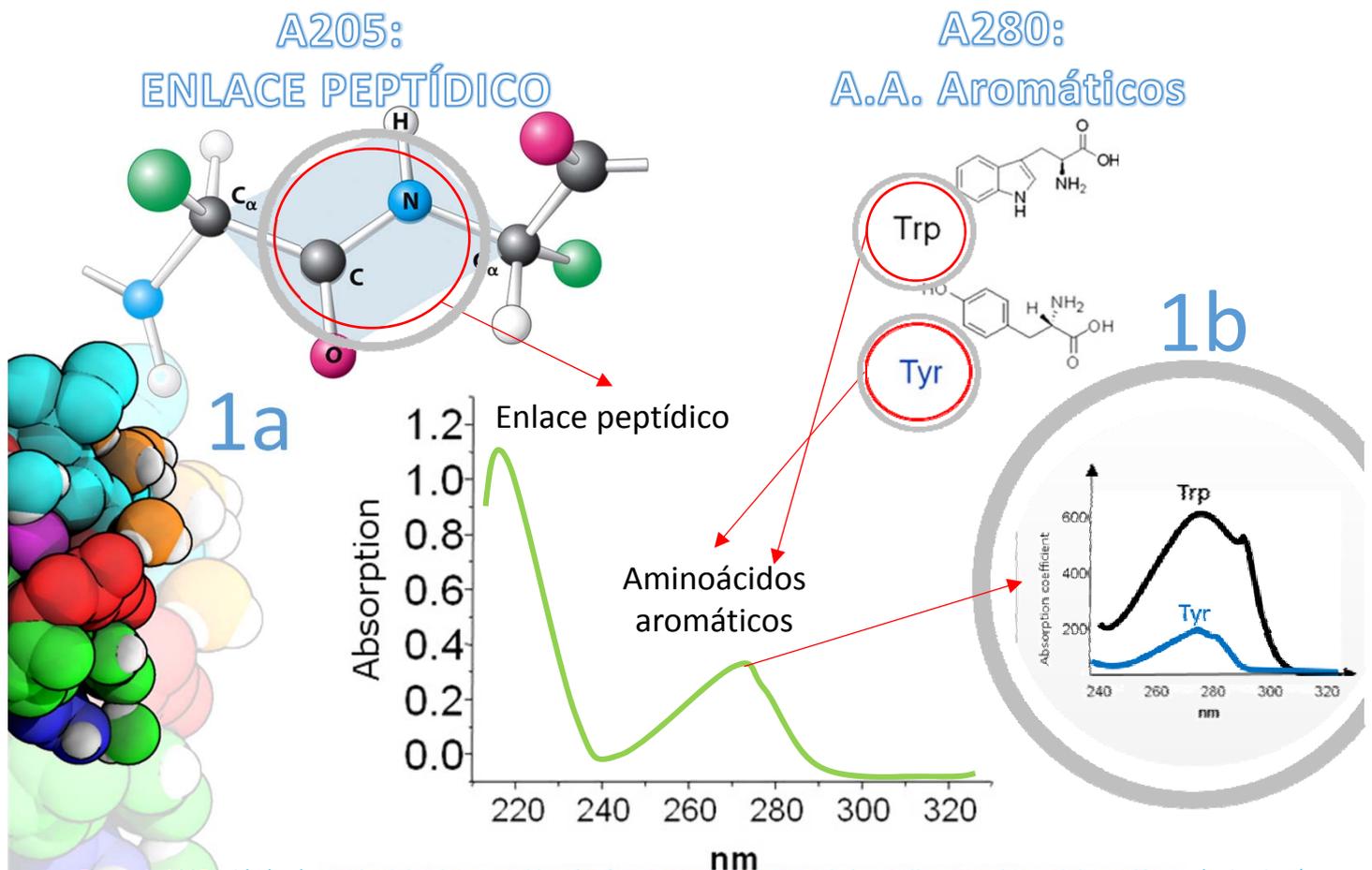


Figura 1. A205 mide la absorción del enlace peptídico (1 a) mientras que A280 mide los anillos aromáticos del triptófano y la tirosina (1 b). Es decir el valor del coeficiente de absorción molar para A280 es directamente proporcional al número de Triptófanos y Tirosinas en la secuencia de la proteína.

CONTROL TECNICA

El esqueleto de enlaces peptídicos de una proteína absorbe luz en la región ultravioleta profundo (190 nm-220 nm). Sin embargo, algunas limitaciones técnicas del pasado impedían realizar mediciones fiables a 205 nm, tales como el desempeño del espectrofotómetro frente a la luz parásita, linealidad en el UV profundo y tampones para estabilización de proteínas que contienen componentes con absorción UV.

La tecnología de retención de la muestra patentada de NanoDrop One y la reducida interferencia de la luz parásita, han simplificado cuantificación de pequeñas cantidades de proteína a través de métodos A205. Este artículo describe varios métodos A205 que se pueden utilizar para cuantificar muestras de proteínas y presentar los datos de desempeño para los diversos métodos en el NanoDrop One.

Aplicación A205 en NanoDrop One

La aplicación A205 de NanoDrop One permite al usuario elegir entre tres opciones diferentes de coeficientes de extinción en función de su aplicación (figura 2c):

- ϵ_{205} = método 31
- método Scopes
- Método personalizable ϵ_{205} 1 mg/ml

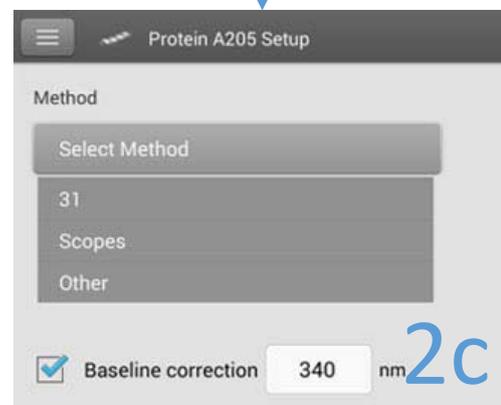
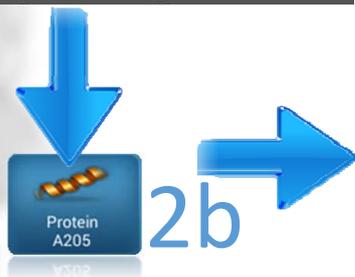
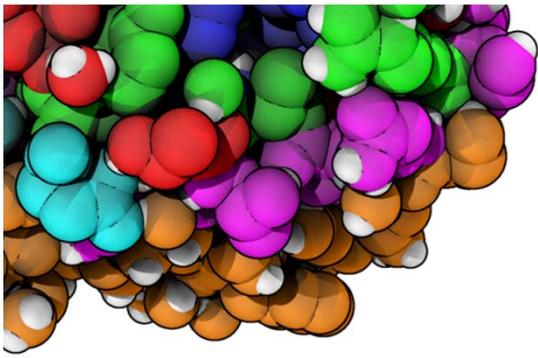


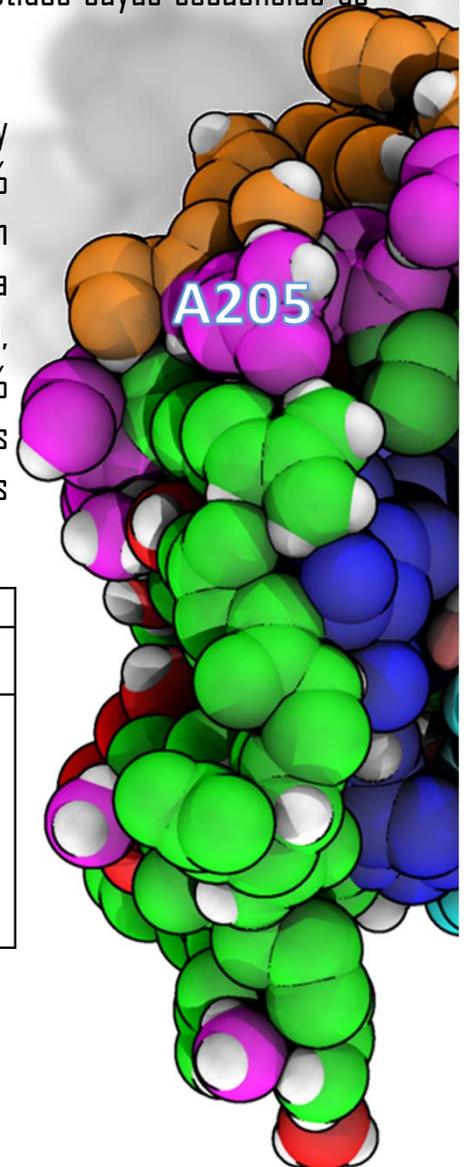
Figura 2. Capturas de pantalla de NanoDrop One. 2a. Distribución del menú de acceso a determinaciones de proteínas en NanoDrop One. 2b. Icono de acceso al método A205. 2c. Métodos disponibles para medición con A205. Método Scopes y Método 31.



Método 31. Estudios previos mostraron que la mayoría de las soluciones de proteínas en 1 mg/ml tienen coeficientes de extinción (ϵ_{205} 1 mg/ml) que van desde 30 a 35. El ϵ_{205} de 31 mg ml⁻¹ cm⁻¹ es un coeficiente de extinción de uso frecuente para los péptidos que carecen de residuos de triptófano (trp) y tirosina (Tyr).

El **método Scopes** da una ϵ_{205} más precisa, especialmente para las proteínas que contienen una cantidad significativa de triptófano (Trp) y tirosina (Tyr). El aumento de la precisión de este método tiene en cuenta las cantidades significativas de absorbancia a 205 nm aportado por las cadenas aromáticas laterales. Este método utiliza el índice A280/A205 en su ecuación para corregir la absorbancia debida a las cadenas laterales Trp y Tyr. Recientemente, Anthis y Clore propusieron el uso de un cálculo ϵ_{205} específico de secuencia, que puede ser adaptado para una amplia gama de proteínas y péptidos. Este método es apropiado para las preparaciones de proteínas purificadas o péptidos cuyas secuencias de aminoácidos se conozcan previamente.

Se realizaron preparaciones a base de Polimixina, un antibiótico y detergente catiónico con esqueleto peptídico, en un tampón 0,01 % Brij 35 y posteriormente fue medido en NanoDrop one y en paralelo en el espectrofotómetro de UV-Vis Evolution 300. Para asegurar la validez de las medidas tomadas con el Evolution 300, las preparaciones Polimixina se diluyeron en el tampón 0,01 % Brij. La dilución de muestras asegura que las mediciones realizadas estuvieran dentro del rango lineal del detector. Las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 mm.



Target [Conc] µg/mL	NanoDrop One			Evolution 300
	A205	Std. Dev.	[Conc]µg/mL	[Conc]µg/mL
0	-0.01	0.04	-0.18	-0.02
5	0.11	0.01	3.60	5.05
10	0.27	0.01	8.84	10.53
15	0.44	0.02	14.08	17.09
50	1.68	0.01	54.14	55.32
100	3.39	0.01	109.44	108.48
200	6.64	0.03	214.16	222.50

Tabla 1. Se probaron varias preparaciones de Polimixina en los espectrofotómetros NanoDrop One y Evolution 300. Se midieron 5 réplicas de cada solución en el NanoDrop One. Las soluciones con absorbancia superiores a 1.0A fueron diluidos y medidos por triplicados en el Evolution 3000 usando una cubeta de cuarzo de 10 mm.

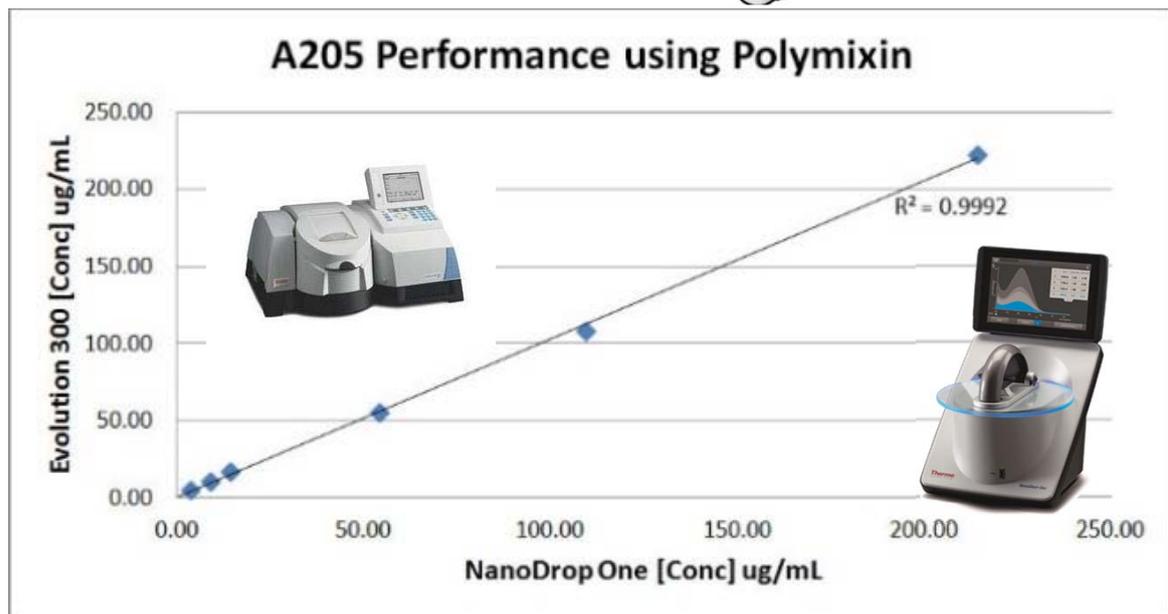


Figura 3. Concentraciones de Polimixina calculadas usando el Evolution 300 y el NanoDrop One. La regresión lineal muestra una buena correlación.

Para evaluar las diferencias entre los distintos coeficientes de extinción utilizados a 205 nm (es decir, Scopes y ϵ_{205} = método 31) se realizaron diversas preparaciones de albúmina de suero bovino (BSA) y lisozima. Estas preparaciones se midieron en el NanoDrop One usando las opciones de medición Scopes y ϵ_{205} = método 31.

Protein Preparation	# of Trp of Tyr				[Concentration] $\epsilon_{205}=31(\mu\text{g/mL})$	[Concentration] Scopes Method ($\mu\text{g/mL}$)
	Trp	Tyr	A205	STDV		
BSA 1	3	21	3.960	0.013	127.73	131.80
BSA 2	3	21	37.271	0.218	1202.30	1261.71
BSA 3	3	21	70.044	0.239	2259.48	2387.91
BSA 4	3	21	129.170	1.458	4166.77	4345.20
BSA 5	3	21	271.027	0.851	8742.81	9198.13
Lysozyme 1	6	3	29.069	0.169	937.71	795.95
Lysozyme 2	6	3	53.651	0.545	1730.68	1459.05
Lysozyme 3	6	3	102.713	0.668	3313.32	2814.79
Polymyxin 1	0	0	0.112	0.015	3.60	3.12
Polymyxin 2	0	0	0.274	0.014	8.84	10.12
Polymyxin 3	0	0	0.437	0.021	14.08	16.03
Polymyxin 4	0	0	1.678	0.014	54.14	60.99
Polymyxin 5	0	0	3.393	0.014	109.44	125.16
Polymyxin 6	0	0	6.639	0.034	214.16	244.87

Tabla 2. Concentraciones de Polimixina calculadas usando el Evolution 300 y el NanoDrop One. La regresión lineal muestra una buena correlación.

Conclusiones

Para evaluar el rendimiento del espectrofotómetro NanoDrop One a A205, se compararon los valores de concentración de Polimixina obtenidos en NanoDrop One contra el espectrofotómetro de sobremesa Evolution 300, que tiene un excelente rendimiento para luz difusa. La tabla 1 muestra que **el NanoDrop arroja resultados consistentes entre mediciones repetidas en 205 nm con una desviación estándar menor a 0.04A**

Además, **los resultados obtenidos con ambos instrumentos fueron comparables** (Figura 3). La comparación entre el diferentes métodos A205 muestra que el número de residuos de triptófano tiene un gran efecto sobre la resultados de concentración (Tabla 2). Esto se debe a que el triptófano es el mayor contribuyente a la absorbancia A280, y el método que utiliza Scopes se vale de la relación A280/A205 para corregir la absorbancia de la cadena lateral aromática en A205. Nuestros resultados muestran que la cuantificación A205 usando el ϵ_{205} = método31 da resultados comparables cuando proteínas tienen sólo unos pocos residuos de triptófano.

Una limitación del método A205 es que muchos de los tampones comúnmente se usan tienen absorbancia a 205 nm. Antes de utilizar esta técnica, se recomienda la comprobación del tampón de estabilización de proteínas para verificar cualquier contribución a la absorbancia a 205 nm entre sus componentes.

NanoDrop™ One

Referencias

1. Anthis, NJ and Clore, GM 2013. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Protein Science* 22:851-858.
2. Goldfarb, AR, Sidel, LJ, Mosovich E 1951. The ultraviolet absorption spectra of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 193(1):397-404.
3. Scopes, RK 1974. Measurement of protein by spectrophotometry a 205 nm. *Analytical Biochemistry*

