

Jméno:	
Obor:	Datum provedení:

TEORETICKÝ ÚVOD

Pro stanovení koncentrace proteinů lze využít několik metod. Koncentraci lze stanovit buď přímo z absorpce ultrafialového (UV) světla nebo nepřímo kolorimetricky chemickou reakcí aminokyselinových zbytků v polypeptidovém řetězci bílkovin s vhodným činidlem, které po reakci změní barvu.

Stanovení koncentrace proteinů z absorpce UV světla

Tato metoda je založena na skutečnosti, že dvě aromatické aminokyseliny, tyrosin a tryptofan, mají absorpční maximum kolem 280 nm. Vzhledem k tomu, že jednotlivé proteiny obsahují různý poměr aromatických aminokyselin, je pro nutné při přímém měření absorpce znát extinkční koeficient proteinu při dané vlnové délce. Metoda je proto výhodnější pro čisté proteiny než pro jejich směsi. Absorbanci lze měřit buď při 280 nm (absorpce aromatických aminokyselin tryptofanu, tyrosinu) nebo při 205 nm (absorpce peptidových vazeb). Je nutné si rovněž uvědomit, že všechny chemické látky absorbující při daných vlnových délkách budou ovlivňovat výsledky měření. Hlavní interferující látkou absorbující při 280 nm bývá nukleová kyselina, která má sice absorpční maximum při 260 nm, ale její absorpce při 280 nm je stále nezanedbatelná. V tomto případě pro přímé UV stanovení koncentrace používáme vzorec zahrnující Warburg-Christianovu korekci způsobenou nukleovou kyselinou:

$$c [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260} \quad (1)$$

Při znalosti aminokyselinového složení je poté možné spočítat molární absorpční koeficient proteinu ϵ_{280} a následně dle Lamber-Beerova zákona i koncentraci příslušného proteinu:

$$\epsilon_{280} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] = nW \times 5500 + nY \times 1490 \quad (2)$$

nW – počet zbytků tryptofanu

nY - počet zbytků tyrosinu

Hlavní výhodou této metody je její rychlost a jednoduchost. Vzhledem k tomu, že u této metody měření koncentrace proteinů není potřeba žádná chemická reakce, je široce používána pro detekci proteinů nebo peptidů v rámci chromatografické separace.

Stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou

Lowryho metodu poprvé navrhl O. H. Lowry v roce 1951. Je založena na Biuretové reakci, využívající reakce měďnatých iontů s imidovými skupinami peptidové vazby v polypeptidovém řetězci proteinu v alkalickém pH za vzniku iontů měďných, které následně reagují s Folinovým nebo Folin-Ciocalteauvým (čti Čikóltovým) činidlem. Folin-Ciocalteauovo činidlo obsahuje kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky proteinů právě za katalýzy Cu^+ iontů, které se generují v biuretové reakci. Výsledná heteropolyfosfomolybdenová modř se stanovuje spektrofotometricky obvykle při 750 nm. Lowryho metoda se vyznačuje oproti biuretové metodě vyšší citlivostí, je však citlivá na změny v pH, kdy pH reakční směsi by mělo být drženo v mezích 10,0-10,5. Nevýhodou metody je tak úzký interval pH reakční směsi, ve kterém je použitelná, avšak použitím malých objemů vzorku (relativně vůči objemu reakční směsi) lze tuto nevýhodu odstranit.

Stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda

Metoda je založena na interakci proteinů s barvou Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) v kyselém prostředí. Při navázání barvy na protein se mění barva roztoku z červeno-hnědé na modrou, přičemž dochází k posunu absorpčního maxima barevného komplexu ze 465 nm na 610 nm. Nejvyšší rozdíl absorpčních maxim má aniontová forma barvy, která se váže na protein a kterou lze současně spektrofotometricky měřit při 595 nm. Za změnu barvy jsou zodpovědné převážně některé bazické aminokyseliny v polypeptidovém řetězci (Lys, Arg, His). Dále k vazbě na protein přispívají i van der Waalsovy síly a hydrofobní interakce. Množství navázané CBB na protein je přibližně přímo úměrné množství pozitivních nábojů na molekule proteinu. Volné aminokyseliny, peptidy a nízkomolekulární proteiny s barvou neinteragují. Poprvé metodu popsal M. M. Bradford v roce 1976.

Stanovení koncentrace proteinů bicinchoninovou metodou

Metoda je založena na podobném principu jako Lowryho metoda s tím rozdílem, že Cu^+ ionty, které se tvoří v alkalickém prostředí, se detekují kyselinou bicinchoninovou (BCA), s kterou tvoří barevný komplex s absorpčním maximem při 562 nm. Poprvé byla metoda popsána P. K. Smithem v roce 1985. Výhodou metody je obecně vyšší tolerance ke sloučeninám, které interferují v Lowryho metodě, a současně je jen málo citlivá k detergentům a denaturačním činidlům (močovina, guanidin).

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Stanovení koncentrace proteinů z absorpce UV světla

Postup práce:

1. Napipetujte 1 ml neznámého vzorku 1 a 2 do UV měřicí kyvety a změřte absorpenci roztoku při 280 nm a 260 nm proti blanku, kterým bude destilovaná voda.
2. Vzorky 1 a 2 v kyvetách si ponechejte pro analýzy v dalších částech úlohy č. 7.

Výpočty:

Určete koncentrace (mg/ml) neznámých vzorků 1 a 2 z Lambert-Beerova zákona dle rovnice (2), když v neznámém vzorku 1 jsou 3 zbytky tryptofanu a 10 zbytků tyrosinu (ovaalbumin) v neznámém vzorku 2 je 6 zbytků tryptofanu a 3 zbytky tyrosinu (lysozym).

Výsledky:

	A_{280}	A_{260}	c (mg/ml) dle rovnice (1)	c (mg/ml) dle rovnice (2)
Vzorek 1				
Vzorek 2				

Porovnejte výsledky koncentrace proteinů vypočtených dle rovnic (1) a (2):

B. Stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou

Postup práce:

1. Připravte si sadu 6 kalibračních roztoků do 1,5 ml zkumavek dle níže uvedené tabulky

Objem vody	Objem zásobního roztoku albuminu (8 mg.ml ⁻¹)
50 µl	0 µl
40 µl	10 µl
30 µl	20 µl
20 µl	30 µl
10 µl	40 µl
0 µl	50 µl

2. Smíchejte v kádince 20 ml roztoku A (2% Na₂CO₃) s 200 µl roztoku B (1% CuSO₄.5H₂O) a 200 µl roztoku C (2% vlnan sodno-draselný), čímž vznikne roztok D.
3. Do 16 prázdných 1.5 ml mikrozkušavek přidejte 10 µl jednotlivých kalibračních roztoků nebo neznámého vzorku 1 nebo 2. U každého kalibračního roztoku a vzorku bude měření provedeno dvakrát (viz. tabulka ve výsledcích). Následně přidejte do každé zkumavky 50 µl 3 M NaOH. Nakonec přidejte do každé zkumavky 0.84 ml roztoku D a promíchejte na vortexu.
4. Reakční směsi nechte inkubovat za laboratorní teploty po dobu 10 minut.
5. Následně přidejte 100 µl Folin-Ciocalteuova činidla (ředění 1:1) a promíchejte na vortexu.
6. Směsi nechte inkubovat za laboratorní teploty po dobu 30 minut.
7. Změřte absorbanci kalibračních roztoků a neznámých vzorků při 750 nm, přičemž blank je destilovaná voda. V případě, že absorbance vzorku bude vyšší než 1, ředte 1:1 vodou a změřte znovu. Při měření kalibračních roztoků a vzorků 1 a 2 použijte jiných kyvet. Při měření kalibračních roztoků můžete použít stejné kyvety v případě, že budete měřit absorbance ve směru od nejnižších po nejvyšší koncentrace.

Výsledky:

1. Doplňte tabulku:

Výsledná koncentrace albuminu (µg.ml ⁻¹)	A ₇₅₀		
	1.	2.	Průměr

Vzorek 1			
Vzorek 2			

2. Sestrojte kalibrační křivku pro albumin (závislost A_{750} na koncentraci albuminu v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kdy body proložte regresní přímkou (lineární regrese):

3. Z kalibrační přímkou odečtěte koncentraci proteinu v neznámém vzorku 1 a 2 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a doplňte do tabulky.

Vzájemně porovnejte zjištěné koncentrace proteinu v neznámém vzorku 1 a 2:

C. Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradforda

Postup práce:

1. Připravte si sadu 7 kalibračních roztoků do 1.5 ml zkumavek dle níže uvedené tabulky

Objem vody	Objem zásobního roztoku albuminu (0,8 mg.ml ⁻¹)
200 µl	0 µl
180 µl	20 µl
160 µl	40 µl
140 µl	60 µl
120 µl	80 µl
100 µl	100 µl
0 µl	200 µl

2. Do 18 prázdných 1.5 ml mikrozkušavek přidejte 0.95 ml činidla dle Bradforda.
3. Následně přidejte do mikrozkušavek 50 µl jednotlivých kalibračních roztoků nebo neznámého vzorku 1 nebo 2 a promíchejte na vortexu. U každého kalibračního roztoku a vzorku bude měření provedeno dvakrát (viz. tabulka ve výsledcích).
4. Směsi nechte inkubovat za laboratorní teploty po dobu 5 minut.
5. Změřte absorbanci kalibračních roztoků a neznámých vzorků při 595 nm, přičemž blank je destilovaná voda. V případě, že absorbance vzorku bude vyšší než 1, ředte 1:1 vodou a změřte znovu. Při měření kalibračních roztoků a vzorků 1 a 2 použijte jiných kyvet. Při měření kalibračních roztoků můžete použít stejné kyvety v případě, že budete měřit absorbance ve směru od nejnižších po nejvyšší koncentrace.

Výsledky:

1. Doplňte tabulku:

Výsledná koncentrace albuminu (µg.ml ⁻¹)	A ₅₉₅		
	1.	2.	Průměr

Vzorek 1			
Vzorek 2			

2. Sestrojte kalibrační křivku pro albumin (závislost A_{595} na koncentraci albuminu v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kdy body proložte regresní přímkou (lineární regrese):

Blank space for drawing the calibration curve and performing linear regression.

3. Z kalibrační přímkou odečtěte koncentraci proteinu v neznámém vzorku 1 a 2 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a doplňte do tabulky.

Vzájemně porovnejte zjištěné koncentrace proteinu v neznámém vzorku 1 a 2:

Blank space for comparing the protein concentrations in unknown samples 1 and 2.

D. Stanovení koncentrace proteinů bicinchoninovou metodou

Postup práce:

1. Připravte si sadu 6 kalibračních roztoků do zkumavek s objemem 1.5 ml dle níže uvedené tabulky

Roztok	Objem vody	
1	700 μl	100 μl zásobního roztoku albuminu ($8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
2	400 μl	400 μl roztoku 1
3	450 μl	300 μl roztoku 2
4	400 μl	400 μl roztoku 3
5	400 μl	100 μl roztoku 4
6	400 μl	

2. Přidejte do 16 mikrozkušavek s objemem 2 ml 100 μl jednotlivých kalibračních roztoků 1-6 nebo neznámého vzorku 1 nebo 2.
3. Smíchejte v kádince 35 ml roztoku E s 0.7 ml roztoku F, čímž vznikne roztok G.
4. Do 2 ml mikrozkušavek s kalibračními roztoky a vzorky 1 a 2 přidejte 1.8 ml roztoku G. U každého kalibračního roztoku a vzorku bude měření provedeno dvakrát (viz. tabulka ve výsledcích).
5. Směsi nechte inkubovat po dobu 30 minut při 60 °C.
6. Směsi nechte chladnout na laboratorní teplotu po dobu 5 minut.
7. Změřte absorbanci kalibračních roztoků a neznámých vzorků 1 a 2 při 562 nm, přičemž blank je destilovaná voda. V případě, že absorbance vzorku bude vyšší než 1, ředte 1:1 vodou a změřte znovu. Při měření kalibračních roztoků a vzorků 1 a 2 použijte jiných kyvet. Při měření kalibračních roztoků můžete použít stejné kyvety v případě, že budete měřit absorbance ve směru od nejnižších po nejvyšší koncentrace.

Výsledky:

1. Doplňte tabulku:

Výsledná koncentrace albuminu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	A_{562}		
	1.	2.	Průměr
Vzorek 1			
Vzorek 2			

2. Sestrojte kalibrační křivku pro albumin (závislost A_{562} na koncentraci albuminu v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kdy body proložte regresní přímkou (lineární regrese):

3. Z kalibrační přímky odečtete koncentraci proteinu v neznámém vzorku 1 a 2 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a doplňte do tabulky.

Vzájemně porovnejte zjištěné koncentrace proteinu v neznámém vzorku 1 a 2:

|

|

Porovnejte výsledky pro neznámé vzorky zjištěné podle různých metod:

|

|