

TEORETICKÝ ÚVOD

UV-VIS spektrofotometrie

Interakcí elektromagnetického záření s atomy a molekulami dochází k přijetí kvanta energie ve formě **fotonů** a následnému zvýšení energie atomu molekuly ze základního stavu do stavu excitovaného. Při absorpci záření o energiích odpovídajících rozsahu vlnových délek 200-2000 nm probíhá excitace valenčních elektronů ozařovaných atomů a molekul. Ze závislosti množství absorbovaného záření na jeho vlnové délce se pro daný atom nebo molekulu získá **absorpční spektrum**, které je pro danou chemickou látku **charakteristické**.

Absorpční efekt látky se popisuje s pomocí fyzikální veličiny transmitance, která udává poměr intenzity vystupujícího světla k intenzitě světla, které do látky vstupuje a vyjadřuje de facto frakci světla, která se látkou pohltí. Jelikož však transmitance není přímo úměrná koncentraci látky, z praktického důvodu se definovala veličina zvaná absorbance.

Absorbanci lze zjistit z **Lambertův-Beerův zákon** dle rovnice (1).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

ε je molární absorpční koeficient a lze jej v podstatě chápat jako materiálovou konstantu, která je specifická, pro každou látku schopnou absorpce výše zmiňovaného elektromagnetického záření s jednotkou $\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, c je molární koncentrace látky v $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a l je délka optické dráhy v cm. Jak je patrné, absorbance stejně jako transmitance je veličina bezrozměrná. V případě, že absorbance blíže nespecifikované látky je 1, znamená to, že po průchodu záření touto látkou, se jeho intenzita sníží desetkrát, pokud je 2 tak stokrát, pokud je 3 tisíckrát atd.

V praxi samozřejmě může nastat případ, kdy je k dispozici směs dvou nebo více různých chemických látek, které absorbují při dané vlnové délce. Měřená absorbance je pak součtem všech dílčích absorbancí.

Aby bylo možné změřit absorbanci, je nutné znát intenzity dvou paprsků, konkrétně referenčního, jehož intenzita se nezměnila a indikačního, který prošel látkou, která se identifikuje. Pokud je pro měření látky k dispozici **jednopaprskový přístroj**, který má jen jednu optickou dráhu, elektromagnetickému záření se nejdříve postaví do cesty referenční vzorek (blank) a množství světla, jež jím projde, je vlastně referencí. Následně se do optické dráhy umístí měřená látka a ze získané intenzity indikačního paprsku v porovnání s paprskem referenčním se vypočítá samotná absorbance. V současnosti je u přístrojů k dispozici paměť, která umožní odečítat závislosti referenčních a indikačních intenzit v závislosti na jednotlivých vlnových délkách záření, které se na látku aplikují. **Dvoupaprskové přístroje** mají odděleny dráhy pro referenční paprsek a pro identifikovanou látku nebo látky. V každém okamžiku proto mohou registrovat intenzitu referenčního a indikačního paprsku a okamžitě vypočítat absorbanci. U výše popsaných přístrojů je monochromátor umístěn před kyvetovým prostorem, takže na látku dopadá vždy pouze elektromagnetické záření jedné konkrétní energie, resp. vlnové délky. Toto monochromatické světlo se po průchodu vzorkem nebo blankem zpracovává detektorem. **Diod-array-detectors (DAD)** jsou spektrofotometry, které zajistí, že celé nefiltrované (polychromatické) světlo ze zdroje projde látkou a následně se teprve prošlé záření rozloží monochromatickou mřížkou, přičemž následně řada fotodiód analyzuje intenzitu světla jednotlivých vlnových délek, které prošlo vzorkem, respektive referenčním roztokem. Nižší kvalitu optických parametrů vyvažuje rychlost měření, jelikož intenzita světla všech vlnových délek se snímá v jediném okamžiku, což je obzvláště výhodné při kinetických měřeních nebo kolonových chromatografiích.

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 molární absorpční 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 190 nm (absorpce peptidových vazeb), ale jelikož běžné spektrofotometry již při této vlnové délce nejsou schopné měřit, využívá se vlnová délka 205 nm, při které k výsledné absorbanci přispívají i některé aminokyseliny jako Trp, Phe, Tyr, Cys, Met a Arg. 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 (1) zahrnující Warburg-Christianovu korekci na nukleovou kyselinou:

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

Při znalosti aminokyselinového složení je také možné spočítat molární absorpční koeficient (2) proteinu ϵ_{280} a následně dle Lambert-Beerova zákona i koncentraci příslušného proteinu:

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

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** (Piotrowského test), 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-Ciocalteauovým** (čti Čikóltovým) činidlem. Folin-Ciocalteauovo činidlo obsahuje směs kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují **tyrosinovými** a **tryptofanovými** zbytky proteinů právě za katalýzy **Cu⁺ iontů**, které se generují v biuretové reakci. Tvořící se **heteropolyfosfomolybdenan** barví reakční směs do modra a ten se současně 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

Poprvé metodu popsal M. M. Bradford v roce 1976. Metoda je založena na interakci proteinů s **barvou Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)** v kyselém prostředí. Volný barevný indikátor existuje ve čtyřech iontových formách s pK_a 1.15, 1.82 a 12.4. 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 při 590 nm, která se váže v kyselém prostředí 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.

Stanovení koncentrace proteinů bicinchoninovou metodou

Poprvé byla metoda popsána P. K. Smithem v roce 1985. 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. 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).

Jméno:	
Obor:	Datum provedení:

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Stanovení koncentrace proteinů z absorpce UV světla

Postup práce:

1. Zapněte UV-VIS spektrofotometr Shimadzu a nechte inicializovat software. Poté zmáčkněte tlačítko enter a přejděte do programu Photometric dvojitým stlačením čísla 1. Funkcí GOTO WL nastavte požadovanou vlnovou délku. Nulování přístroje na blank se zajistí funkcí AUTO ZERO.
2. Napipetujte 1 ml neznámého vzorku 1 a 2 do UV měřící kyvety a změřte absorbanci roztoku při 280 nm a 260 nm proti blanku, kterým bude destilovaná voda.
3. 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 (2 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

- Smíchejte v kádince 20 ml roztoku A (2% Na₂CO₃) s 200 μl roztoku B (1% CuSO₄.5H₂O) a 200 μl roztoku C (2% vínan sodno-draselný), čímž vznikne roztok D.
- 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.
- Reakční směsi nechte inkubovat za laboratorní teploty po dobu 10 minut.
- Následně přidejte 100 μl Folin-Ciocalteuova činidla (ředění 1:1) a promíchejte na vortexu.
- Směsi nechte inkubovat za laboratorní teploty po dobu 30 minut.
- Zapněte VIS spektrofotometr ONDA a nechte jej 20 minut žhavit na provozní teplotu. Poté funkcí GOTO λ nastavte s pomocí vertikálních šipek požadovanou vlnovou délku. Při dalších měření v části C a D úlohy č. 7 již stačí, když budete měnit vlnovou délku přes výše popsanou funkci, přístroj se po zapnutí po celou dobu úlohy nechává v provozu.
- 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 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	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):

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 ($0,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
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 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	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):

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:

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 μ l	100 μ l zásobního roztoku albuminu (2 mg.ml ⁻¹)
2	400 μ l	400 μ l roztoku 1
3	450 μ l	300 μ l roztoku 2
4	400 μ l	400 μ l roztoku 3
5	400 μ l	100 μ l roztoku 4
6	400 μ l	

2. Přidejte do 16 mikrozkuvek s objemem 2 ml 100 μ l 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 mikrozkuvek 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. Doplněte 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):

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

Porovnejte výsledky pro neznámé vzorky zjištěné podle různých metod:

[

]