

jméno:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)	

přílohy protokolu: 3x kalibrační přímka (stanovení bílkovin fotometricky v UV oblasti, stanovení bílkovin Folinovou metodou, stanovení bílkovin bicinchoninovou metodou).

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Absorbující složky bílkovin. Absorpční spektrum bílkovin. Principy metod stanovení bílkovin. Struktura aminokyselin. Lambertův-Beerův zákon. Chemické výpočty.

PRINCIP ÚLOHY

A. Spektrofotometrické stanovení bílkovin v UV oblasti.

Aromatická jádra aminokyselin tyrosinu a tryptofanu, které jsou obsaženy v bílkovinách, silně absorbují UV záření s absorpčním maximem v oblasti vlnových délek 275 až 290 nm, fenylalanin absorbuje slaběji s maximem v okolí vlnové délky 260 nm (silnou absorpci v okolí vlnové délky 260 nm vykazují nukleové kyseliny). **Celková koncentrace bílkovin** ve vzorku se proto velmi často stanovuje **spektrofotometricky** na základě absorpce při vlnové délce **280 nm**, je-li k dispozici vhodný standardní vzorek.

Absorpci bílkovin lze měřit i při kratších vlnových délkách (např. **235 nm**), kde UV světlo silně absorbují kromě tryptofanových a tyrosinových zbytků také postranné řetězce fenylalaninu, histidinu, methioninu a cysteinu a rovněž peptidové vazby. Absorpce bílkovin při velmi krátkých vlnových délkách (kolem 200 nm) je méně závislá na jejich aminokyselinovém složení, zejména při **205 nm** absorbují velmi silně peptidové vazby. K dispozici je však nutné mít velmi čisté vzorky (v této oblasti spektra absorbuje mnoho různých látek včetně nečistot v destilované vodě).

B. Stanovení koncentrace bílkovin Folinovou metodou.

Metoda je založena na oxidaci postranního řetězce **tyrosinu** v molekulách bílkovin fosfomolybdenanem a fosfowolframanem za vzniku barevných produktů (sloučenin pětimocného molybdenu a wolframu) s absorpčním maximem při vlnové délce **745 nm**, jejichž koncentraci lze stanovit fotometricky. Je citlivější než biuretová metoda a lze ji využít pro analýzu vzorků obsahujících řádově desetiny miligramu proteinu v ml.

Metoda byla k různým účelům dále modifikována (podle **Lowryho**, podle Hartree a Lowryho), tyto modifikace se vyznačují ještě vyšší citlivostí a dodávají se komerčně v setech pro rutinní stanovení ve výzkumu i praxi.

C. Stanovení koncentrace bílkovin bicinchoninovou metodou.

Poprvé byla tato metoda popsána P. K. Smithem v roce 1985. Jejím principem je tvorba Cu^+ iontů, které se tvoří v alkalickém prostředí jako redukční produkt vlivem přítomnosti tyrosinových a tryptofanových zbytků v molekulách bílkovin. **Měďné** ionty se pak detekují **kyselinou bicinchoninovou (BCA)**, se 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, guanidín).

PRAKTICKÁ ČÁST A. Spektrofotometrické stanovení bílkovin v UV oblasti.

Materiál a vybavení:

2,5 mmol.l⁻¹ roztok fenyylalaninu (**Phe**), 0,25 mmol.l⁻¹ roztok tyrosinu (**Tyr**), 0,1 mmol.l⁻¹ roztok tryptofanu (**Trp**)

standardní roztok bílkoviny - hovězí sérový albumin (**BSA**) (2,5 mg.ml⁻¹)

neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu (obsahuje BSA o neznámé koncentraci)

hovězí krevní sérum (**KS**)

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

zkumavky, pipety, dávkovače, odměrné baňky 10 ml a 50 ml, vortex, fotometr, UV-propustné kyvety

Postup:

Fotometrické stanovení bílkovin v UV oblasti. Standardní roztok BSA (2,5 mg.ml⁻¹) zřed'te tak, že 4 ml standardního roztoku BSA doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promícháte. Stejným způsobem zřed'te vzorek BSA o neznámé koncentraci. Vzorek krevního séra zřed'te tak, že 0,25 ml KS doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 50 ml a dobře promícháte. Podle tabulky připravte jednak sadu roztoků vzorků o známých koncentracích BSA k sestrojení kalibrační závislosti (zkumavky 1-6), dále 2 paralelní zkumavky se zředěným roztokem BSA o neznámé koncentraci (zkumavky 7-8) a 2 zkumavky se zředěným roztokem KS (zkumavky 9-10). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok – nulová koncentrace bílkoviny) použijte jako slepý vzorek.

zkumavka č.	pipetovaný objem				vypočtená c(BSA) [mg.ml ⁻¹]	A ₂₈₀
	zředěný standardní roztok BSA [ml]	zředěný neznámý vzorek [ml]	zředěný roztok KS [ml]	fyziol. roztok [ml]		
1	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,000
2	0,4	0,0	0,0	1,6		
3	0,8	0,0	0,0	1,2		
4	1,2	0,0	0,0	0,8		
5	1,6	0,0	0,0	0,4		
6	2,0	0,0	0,0	0,0		Ø A ₂₈₀
7	0,0	2,0	0,0	0,0	?	
8	0,0	2,0	0,0	0,0		
9	0,0	0,0	2,0	0,0	?	
10	0,0	0,0	2,0	0,0		

Změřte absorbanci roztoků ve zkumavkách 2-10 při vlnové délce 280 nm proti slepému vzorku (zkumavka č.1). **Měření provádějte v plastových kyvetách pro UV oblast.** Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek zřed'te v poměru 1:1 fyziologickým roztokem a naměřenou hodnotu absorbance vynásobte dvěma. Výsledky uveďte do tabulky.

Studium absorpčního spektra bílkovin. Prostudujte absorpční spektra roztoků fenyylalaninu, tyrosinu, tryptofanu a zředěného standardního vzorku BSA v oblasti vlnových délek 230–300 nm, která jsou uložena v počítači. Pro každou látku odečtete vlnovou délku λ_{\max} absorpčního maxima, dále hodnoty absorbance A_{\max} v absorpčním maximu, запиšte si koncentraci látky c a ze získaných dat vypočítejte hodnoty ϵ milimolárních nebo miligramových absorpčních koeficientů (délka optické dráhy v kyvetě je vždy 1 cm). Získaná a vypočtená data uveďte do tabulky.

	λ_{\max} [nm]	c	A_{\max}	ϵ (uved'te fyzikální rozměr!)
Phe		mmol.l ⁻¹		
Tyr		mmol.l ⁻¹		
Trp		mmol.l ⁻¹		
BSA		mg.ml ⁻¹		

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace BSA ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky. Vypočítejte průměr absorbancí ve zkumavkách č. 7-8 a 9-10 a doplňte do tabulky.

Sestrojte kalibrační graf (závislost A_{280} na koncentraci BSA ve zkumavce). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte **koncentraci BSA ve zředěném neznámém vzorku a ve zředěném krevním séru** (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek při přípravě zředěného neznámého vzorku a kolikrát bylo zředěno krevní sérum.

Ředění neznámého vzorku: krát

Ředění krevního séra : krát

Tímto faktorem vynásobte koncentraci BSA ve zředěném neznámého vzorku a ve zředěném krevním séru, abyste získali koncentraci BSA v původním neznámého vzorku a v krevním séru.

Výsledek:

koncentrace BSA v neznámém vzorku: c = mg.ml⁻¹

koncentrace bílkovin v krevním séru: c = mg.ml⁻¹

PRAKTICKÁ ČÁST B. Stanovení koncentrace bílkovin Folinovou metodou.

Materiál a vybavení:

standardní roztok bílkoviny – hovězí sérový albumin (BSA) ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$)
neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu (obsahuje BSA o neznámé koncentraci)
 hovězí krevní sérum (KS)
 fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)
 5 mol.l^{-1} hydroxid sodný
 Folinovo činidlo (roztok fosfomolybdenanu a fosfowolframanu)
 zkumavky, pipety, dávkovače, odměrné baňky 10 ml, vortex, fotometr, kyvety

Postup:

Standardní roztok BSA ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) zřed'te tak, že 1 ml standardního roztoku BSA doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promícháte. Stejným způsobem zřed'te neznámý vzorek BSA. Vzorek krevního séra zřed'te tak, že 0,2 ml KS doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml, dobře promícháte, a z takto naředěného roztoku odeberete 1 ml, který v další odměrné baňce doplníte fyziologickým roztokem na objem 10 ml a promícháte. Podle tabulky připravte jednak sadu roztoků vzorků o známých koncentracích BSA k sestrojení kalibrační závislosti (zkumavky 1-6), dále 2 paralelní zkumavky s roztokem BSA o neznámé koncentraci (zkumavky 7-8) a 2 zkumavky ze zředěným roztokem KS (zkumavky 9-10). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok – nulová koncentrace bílkoviny) použijte jako slepý vzorek.

zkumavka č.	pipetovaný objem				vypočtená c(BSA) [mg.ml^{-1}]	A_{745}
	zředěný standardní roztok BSA [ml]	zředěný neznámý vzorek [ml]	zředěný roztok KS [ml]	fyziol. roztok [ml]		
1	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,000
2	0,4	0,0	0,0	1,6		
3	0,8	0,0	0,0	1,2		
4	1,2	0,0	0,0	0,8		
5	1,6	0,0	0,0	0,4		
6	2,0	0,0	0,0	0,0		$\emptyset A_{745}$
7	0,0	2,0	0,0	0,0	?	
8	0,0	2,0	0,0	0,0		
9	0,0	0,0	2,0	0,0	?	
10	0,0	0,0	2,0	0,0		

Poté do všech zkumavek 1-10 pipetujte vždy 0,2 ml 5 mol.l^{-1} NaOH, promíchejte na vortexu, přidejte 0,3 ml Folinova činidla a opět promíchejte. Po 5 minutách stání při laboratorní teplotě změřte absorbanci při vlnové délce **745 nm** proti slepému vzorku (zkumavka č.1). **Měření provádějte v běžných plastových kyvetách.** Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek zřed'te v poměru 1:1 fyziologickým roztokem a naměřenou hodnotu absorbance vynásobte dvěma. Výsledky uveďte do tabulky.

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace BSA ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky. Vypočítejte průměr absorbancí ve zkumavkách č. 7-8 a 9-10 a doplňte do tabulky.

Sestrojte kalibrační graf (závislost A_{745} na koncentraci BSA ve zkumavce). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte **koncentraci BSA ve zředěném neznámém vzorku a ve zředěném krevním séru** (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek při přípravě zředěného neznámého vzorku a kolikrát bylo zředěno krevní sérum.

Ředění neznámého vzorku: krát

Ředění krevního séra: krát

Tímto faktorem vynásobte koncentraci BSA ve zředěném neznámého vzorku a ve zředěném krevním séru, abyste získali koncentraci BSA v původním neznámého vzorku a v krevním séru.

Výsledek:

koncentrace BSA v neznámém vzorku: c = mg.ml⁻¹

koncentrace bílkovin v krevním séru: c = mg.ml⁻¹

PRAKTICKÁ ČÁST C. Stanovení koncentrace bílkovin bicinchoninovou metodou.

Materiál a vybavení:

standardní roztok bílkoviny – hovězí sérový albumin (BSA) ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$)
neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu (obsahuje BSA o neznámé koncentraci)
 hovězí krevní sérum (KS)
 fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)
 roztok A (0,1 % kyselina bicinchoninová, 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,16 % monohydrát vlnanu sodného, 0,95 % NaHCO_3 , pH 11,25 upravené NaOH)
 roztok B (5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
 mikrozkušavky 1,5 ml a 2 ml, pipety, dávkovače, kádinky 50 ml, fotometr, kyvety, termoblok

Postup:

Smíchejte v kádince 35 ml roztoku A s 0,7 ml roztoku B, čímž vznikne roztok C. Standardní roztok BSA ($2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) zřed'te tak, že smícháte ve 2 ml mikrozkušavce 0,6 ml standardního roztoku BSA s 0,9 ml fyziologického roztoku a dobře promícháte. Stejným způsobem zřed'te neznámý vzorek BSA. Vzorek krevního séra zřed'te následovně: 0,2 ml KS doplňte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promíchejte, z takto zředěného KS poté odeberte 1 ml, který v další odměrné baňce doplňte fyziologickým roztokem na objem 10 ml s následným promícháním. Podle tabulky připravte jednak sadu paralelních roztoků vzorků o známých koncentracích BSA k sestrojení kalibrační závislosti (mikrozkušavky 1-11), dále 2 paralelní mikrozkušavky s roztokem BSA o neznámé koncentraci (č. 12-13) a 2 paralelní mikrozkušavky se zředěným roztokem KS (č. 14-15). Obsah mikrozkušavek promíchejte na vortexu. Obsah mikrozkušavky č. 1 (fyziologický roztok – nulová koncentrace bílkoviny) použijte jako slepý vzorek.

Mikrozkušavka (2.0 ml) č.	pipetovaný objem				vypočtená c(BSA) [mg.ml^{-1}]	A_{562}	$\emptyset A_{562}$
	zředěný standardní roztok BSA [μl]	zředěný neznámý vzorek [μl]	zředěný roztok KS [μl]	fyziol. roztok [μl]			
1	0	0	0	200	0,0	0,000	0,000
2	20	0	0	180			
3	20	0	0	180			
4	40	0	0	160			
5	40	0	0	160			
6	60	0	0	140			
7	60	0	0	140			
8	80	0	0	120			
9	80	0	0	120			
10	100	0	0	100			
11	100	0	0	100			
12	0	100	0	100	?		
13	0	100	0	100			
14	0	0	200	0	?		
15	0	0	200	0			

Poté do všech mikrozkušavek 1-15 pipetujte vždy 1,6 ml roztoku C a promíchejte na vortexu. Po 30 minutách inkubace při 60°C v termobloku a následném zchladnutí vzorků za laboratorní teploty po dobu 5 minut změřte absorbanci při vlnové délce 562 nm proti slepému vzorku (mikrozkušavka č.1). **Měření provádějte v běžných plastových kyvetách.** Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek zřed'te v poměru 1:1 fyziologickým roztokem a naměřenou hodnotu absorbance vynásobte dvěma. Výsledky uveďte do tabulky.

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace BSA roztoků č. 2-11, výsledky doplňte do tabulky. Vypočítejte průměr absorbancí všech roztoků včetně neznámého vzorku BSA a vzorku krevního séra.

Z prvních 6 hodnot absorbancí sestrojte kalibrační graf (závislost A_{562} na koncentraci BSA). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte **koncentraci BSA v neznámém vzorku a ve zředěném krevním séru** (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek při přípravě zředěného neznámého vzorku a kolikrát bylo zředěno krevní sérum.

Ředění neznámého vzorku: krát

Ředění krevního séra: krát

Tímto faktorem vynásobte koncentraci BSA ve zředěném neznámého vzorku a ve zředěném krevním séru, abyste získali koncentraci BSA v původním neznámého vzorku a v krevním séru.

Výsledek:

koncentrace BSA v neznámém vzorku:	c =	mg.ml ⁻¹
koncentrace bílkovin v krevním séru:	c =	mg.ml ⁻¹

Souhrn výsledků:

koncentrace bílkoviny ve vzorku BSA o neznámé koncentraci

zjištěná fotometricky při $\lambda=280$ nm:	c =	mg.ml ⁻¹
zjištěná Folinovou metodou	c =	mg.ml ⁻¹
zjištěná bicinchoninovou metodou	c =	mg.ml ⁻¹

koncentrace bílkoviny v krevním séru

zjištěná fotometricky při $\lambda=280$ nm:	c =	mg.ml ⁻¹
zjištěná Folinovou metodou	c =	mg.ml ⁻¹
zjištěná bicinchoninovou metodou	c =	mg.ml ⁻¹

Pokuste se o vysvětlení rozdílů mezi výsledky stanovení koncentrací bílkoviny v tomtéž vzorku různými metodami. Kromě případných experimentálních chyb hledejte příčiny v chemických principech jednotlivých metod. Kterou z použitých metod považujete za nejpřesnější?

KONTROLNÍ LIST

jméno:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)	

ÚLOHA 4A

Zkumavka č.	A ₂₈₀	Zkumavka č.	A ₂₈₀
1	0,000	6	
2		7	
3		8	
4		9	
5		10	

Podpis vedoucího cvičení:

	λ_{\max} [nm]	c	A _{max}
Phe		mmol.l ⁻¹	
Tyr		mmol.l ⁻¹	
Trp		mmol.l ⁻¹	
BSA		mg.ml ⁻¹	

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 4B

Zkumavka č.	A ₇₄₅	Zkumavka č.	A ₇₄₅
1	0,000	6	
2		7	
3		8	
4		9	
5		10	

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 4C

Zkumavka č.	A ₅₆₂	Zkumavka č.	A ₅₆₂	Zkumavka č.	A ₅₆₂
1	0,000	6		11	
2		7		12	
3		8		13	
4		9		14	
5		10		15	

Podpis vedoucího cvičení: