

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. 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. 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-Christian 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

Stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou

Lowryho metoda je založena na Biuretové reakci, využívající chelataci měďnatého iontu imidovými skupinami peptidové vazby v polypeptidovém řetězci proteinu v alkalickém pH za vzniku červeno-fialový komplex a reakci s Folin-Ciocalteu činidlem. Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahuje kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky proteinů a barví se modře. 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 barvy ze 465 nm na 610 nm. Nejvyšší rozdíl absorpčních maxim jednotlivých forem barvy je při 595 nm, což je také ideální vlnová délka pro měření. 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.

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Stanovení koncentrace proteinů z absorpce UV světla

Postup práce:

1. 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.

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 zkumavek dle níže uvedené tabulky

Objem vody	Objem zásobního roztoku ovalbuminu ($8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
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. Do 16 prázdných 2 ml mikrozkušavek přidejte 0.84 ml roztoku A (směs 50 ml 2% Na_2CO_3 a 1ml 0,5% CuSO_4 v 1% vlnanu sodno-draselném) a 50 μl 0,1 M NaOH.
3. Následně přidejte do mikrozkušavek 10 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. 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.

Výsledky:

1. Doplňte tabulku:

Výsledná koncentrace ovalbuminu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	A_{750}		
	1.	2.	Průměr
[]	[]	[]	[]
[]	[]	[]	[]
[]	[]	[]	[]
[]	[]	[]	[]
[]	[]	[]	[]
[]	[]	[]	[]
Vzorek 1	[]	[]	[]
Vzorek 2	[]	[]	[]

2. Sestrojte kalibrační křivku pro ovalbumin (závislost A_{750} na koncentraci ovalbuminu v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kdy body včetně 0 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 zkumavek dle níže uvedené tabulky

Objem vody	Objem zásobního roztoku ovalbuminu (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 2 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.

Výsledky:

1. Doplňte tabulku:

Výsledná koncentrace ovalbuminu (μg.ml ⁻¹)	A ₅₉₅		
	1.	2.	Průměr
[[]]	[[]]	[[]]	[[]]
[[]]	[[]]	[[]]	[[]]
[[]]	[[]]	[[]]	[[]]
[[]]	[[]]	[[]]	[[]]

Vzorek 1			
Vzorek 2			

2. Sestrojte kalibrační křivku pro ovalbumin (závislost A_{595} na koncentraci ovalbuminu v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kdy body včetně 0 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:

[

]

Porovnejte výsledky pro neznámé vzorky zjištěné podle různých metod:

[

]