

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

přílohy protokolu: 3x graf: kalibrační přímka pro stanovení bílkovin fotometricky v UV oblasti, kalibrační přímka pro stanovení bílkovin biuretovou metodou, kalibrační přímka pro stanovení bílkovin Folinovou metodou.

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Absorbující složky bílkovin. Absorpční spektrum bílkovin. Principy metod stanovení bílkovin. Lambertův-Beerův zákon. Stechiometrie neutralizačních titrací. Chemické výpočty.

Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).

Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen části C, D.

Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): jen části A, C, D.

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.

B. Stanovení hmotnostního zlomku tyrosinu a tryptofanu v bílkovině

Schopnost jednotlivých bílkovin absorbovat UV záření se velmi liší v závislosti na obsahu tyrosinu a tryptofanu, absorpční koeficient se u různých bílkovin může lišit až desetinásobně. Podíl tyrosinu a tryptofanu v bílkovině lze určit změřením absorbance vzorku se známou koncentrací bílkoviny při dvou vlnových délkách v UV oblasti (vlnová délka absorpčního maxima /280 nm/ a vlnová délka bodu, kde se absorpční spektra obou aminokyselin protínají /294 nm/) v alkalickém prostředí).

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 (kolem 200 nm) vlnových délkách 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).

C. Stanovení 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.

D. 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 jako redukční produkt vlivem přítomnosti tyrosinových a tryptofanových zbytků v molekulách bílkovin, 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).

PRAKTICKÁ ČÁST A. Spektrofotometrické stanovení bílkovin v UV oblasti

Materiál a vybavení:

2,5 mmol.l⁻¹ roztok fenylalaninu (**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 šesti 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 ze zředěným roztokem KS (zkumavky 9-10). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok - nulová koncentrace bílkoviny) použijete později 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 fenylalaninu, 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 absorbcí 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 hmotnostního zlomku tyrosinu a tryptofanu v bílkovině

Materiál a vybavení:

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

0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný

0,1 mol.l⁻¹ hydroxid sodný

zkumavky, pipety, dávkovače, vortex, fotometr, UV-propustné kyvety

Postup:

K 1 ml standardního roztoku BSA přidejte 1 ml 0,2 mol.l⁻¹ roztoku NaOH a dále 3 ml roztoku 0,1 mol.l⁻¹ NaOH. Změřte absorbanci vzorku při vlnových délkách 280 a 294 nm proti vodě a zapište do tabulky. **Měření provádějte v plastových kyvetách pro UV oblast.**

A _{280, BSA} :	
A _{294, BSA} :	

Vyhodnocení:

Pro stanovení hmotnostního zlomku Tyr a Trp v BSA si nejprve vypočítejte miligramové absorpční koeficienty (na základě tabulkových molárních absorpčních koeficientů a známé relativní molekulové hmotnosti látek), vypočtené hodnoty doplňte do tabulky.

	λ [nm]	ε [mol ⁻¹ .l.cm ⁻¹]*	M _r	ε [mg ⁻¹ .ml.cm ⁻¹]*
Tyr	280	1576	181,2	
	294	2375		
Trp	280	5225	204,2	
	294	2375		

*absorpční koeficient pro Tyr nebo Trp rozpuštěný v 0,1 mol.l⁻¹ NaOH

Přijměte zjednodušení, že roztok BSA je směsí aminokyselin (zanedbáváme vliv uspořádaných struktur v bílkovině na absorpci UV záření aromatickými jádry aminokyselin obsažených v BSA) a vypočítejte hmotnostní koncentraci Tyr a Trp v roztoku BSA řešením soustavy 2 rovnic o 2 neznámých:

$$A_{280,BSA} = c_{Tyr} \cdot \epsilon_{280,Tyr} + c_{Trp} \cdot \epsilon_{280,Trp}$$

$$A_{294,BSA} = c_{Tyr} \cdot \epsilon_{294,Tyr} + c_{Trp} \cdot \epsilon_{294,Trp}$$

Výpočet:

$$c_{Tyr} = \quad \text{mg.ml}^{-1}$$

$$c_{Trp} = \quad \text{mg.ml}^{-1}$$

Vypočítejte koncentraci BSA ve vzorku (po zředění) a hmotnostní zlomek tyrosinu a tryptofanu v BSA:

$$c_{BSA} = \quad \text{mg.ml}^{-1}$$

$$w_{Tyr} = \quad \%$$

$$w_{Trp} = \quad \%$$

:

Odpovězte na následující otázky:

Kolik druhů aminokyselin obsahují (běžně) bílkoviny?

Jaký je přibližný hmotnostní zlomek každé aminokyseliny v bílkovinách? (předpokládejte rovnoměrné zastoupení všech aminokyselin a jejich přibližně stejnou molekulovou hmotnost)

Které aminokyseliny se nejvíce podílí na absorpci bílkovin v oblasti kolem 280 nm?

Kolik % těchto aminokyselin obsahuje BSA (viz předchozí měření)?

Jaký je absorpční koeficient (při 280 nm) BSA (viz část A úlohy)?

Miligramový absorpční koeficient (při 280 nm) většiny bílkovin se pohybuje v rozmezí 1–5 mg⁻¹.ml.cm⁻¹. Srovnajte s nimi miligramový absorpční koeficient BSA a rozdíl vysvětlete.

PRAKTICKÁ ČÁST C. Stanovení bílkovin Folinovou metodou

Materiál a vybavení:

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)

fyzilogický 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 mg.ml⁻¹) zřeďte tak, že 1 ml standardního roztoku BSA doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promícháte. Stejným způsobem zřeďte neznámý vzorek BSA. Vzorek krevního séra zřeďte 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 šesti 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) použijete později 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		Ø 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, připipetujte 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 zřeďte 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 D. Stanovení koncentrace proteinů bicinchoninovou metodou

Materiál a vybavení:

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)

roztok A (0,1 % kyselina bicinchoninová, 2 % Na₂CO₃.H₂O, 0,16 % monohydrát vlnanu sodného, 0,95 % NaHCO₃, pH 11,25 upravené NaOH)

roztok B (5 % CuSO₄.5H₂O)

mikrozkušavky 1,5ml a 2ml, 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 mg.ml⁻¹) zřeďte tak, že smícháte ve 2.0 ml mikrozkušavce 0.5 ml standardního roztoku BSA s 1 ml fyziologického roztoku a dobře promíchejte. Stejným způsobem zřeďte neznámý vzorek BSA. Vzorek krevního séra zřeďte tak, že 0,2 ml KS doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promíchejte. Podle tabulky připravte jednak sadu paralelních roztoků vzorků o šesti známých koncentracích BSA k sestrojení kalibrační závislosti (zkumavky 1-10), dále 2 paralelní zkumavky s roztokem BSA o neznámé koncentraci (zkumavky 11-12) a 2 paralelní zkumavky se zředěným roztokem KS (zkumavky 13-14). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok – nulová koncentrace bílkoviny) použijete později jako slepý vzorek.

Mikrozkušavka (2.0 ml) č.	pipetovaný objem				vypočtená c(BSA) [mg.ml ⁻¹]	A ₅₆₂	Ø 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	
2	25	0	0	175			
2	25	0	0	175			
3	50	0	0	150			
4	50	0	0	150			
5	100	0	0	100			
6	100	0	0	100			
7	150	0	0	50			
8	150	0	0	50			
9	200	0	0	0			
10	200	0	0	0			
11	0	200	0	0	?		
12	0	200	0	0	?		
13	0	0	200	0	?		
14	0	0	200	0	?		

Poté do všech zkumavek 1-14 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 (zkumavka č.1). **Měření provádějte v běžných plastových kyvetách.** Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek zřeďte v poměru 1:1 fyziologickým roztokem a naměřenou hodnotu absorbance vynásobte dvěma. Výsledky uveďte do tabulky.

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace BSA roztoků č. 1-10, výsledky doplňte do tabulky. Vypočítejte průměr absorbancí roztoků č. 2-6 a neznámého vzorku BSA nebo vzorku krevního séra.

Sestrojte kalibrační graf (závislost A_{562} na koncentraci BSA v mikrozkuhavce). 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 = <input type="text"/> mg.ml⁻¹
koncentrace bílkovin v krevním séru: c = <input type="text"/> 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

Souhrn výsledků:		
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	ÚLOHA 4C	ÚLOHA 4D	ÚLOHA 4D
Zkumavka/ roztok č.	A ₂₈₀	A ₇₄₅	A ₅₆₂ 1.měření	A ₅₆₂ 2.měření
1	0,000	0,000		
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 4A

	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

A _{280, BSA} :	
A _{294, BSA} :	

Podpis vedoucího cvičení: