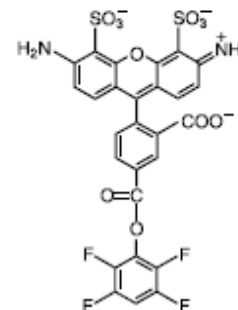


Fluorescenční značení proteinu

Fluorescenční značení proteinu bude provedeno za použití soupravy Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit. Fluorescenční značka Alexa Fluor 488 je spektrálně podobná fluoresceinu, ale na rozdíl od něj není její fluorescence citlivá na pH mezi 4 a 10. Proteiny značené tímto fluoroforem vykazují excitační maximum 494 nm a emisní maximum 519 nm. Alexa Fluor 488 je ve formě TFP (tetrafluorfenyl) esteru viz. Obr. 1, který je v roztoku stabilnější než nejčastěji používaný NHS (sukcinimidyl) ester. Za použití následujícího postupu lze fluorescenčně naznačit 0.1 až 1 mg proteinu.



Obr. 1 AlexaFluor 488

Příprava proteinu

Pro optimální efektivitu značení by měl být protein ve fosfátovém pufru bez amonných iontů a primárních aminů. V případě, že protein je v jiném pufru (Trisový, glycinový), je možno dialýzou pufr změnit.

Výsledná koncentrace roztoku proteinu na značení by měla být 2 mg/mL.

Materiál

- Alexa Fluor 488
- Mikrozkušavka s magnetickým míchadlem
- Roztok proteinu (8 mg/ml) ve fosfátovém pufru
- 1M roztok hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO₃, MW = 84), 1ml
- Kolona PD-10 Desalting Column (GE Healthcare)

Značení proteinu

Připravte 1M roztok rozpuštěním 84 mg NaHCO₃ v 1 ml dest. H₂O. Tento roztok, který má pH ~ 9 může být skladován až dva týdny při 4°C nebo může být rozdělen do alikvotů a zamražen (<-20°C).

Do skleněné vialky (4 mL) napipetujte 25 µl roztoku proteinu (c = 8 mg/ml).

Jestliže je koncentrace proteinu vyšší než 2 mg/ml, roztok se naředí přidáním fosfátového pufru na výslednou koncentraci 2 mg/ml.

Zkušavku s fluorescenční značkou nechte zahřát na laboratorní teplotu. Přidejte 10 µl 1M NaHCO₃ a promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Odpipetujte roztok fluorescenční barvičky do mikrozkušavky s proteinem a promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

Vše nechte míchat ve skleněné vialce s magnetickým míchadlem po dobu 1 h při laboratorní teplotě.

Pozn. NaHCO₃ se přidává, aby se zvýšilo pH reakční směsi, protože TFP estery reagují nejlépe při alkalickém pH.

Asi 20 minut před koncem inkubace připravte kolonu pro separaci proteinu a nenavázané fluorescenční značky.

Purifikace proteinu

Ustříhnete špičku kolony PD-10, kolonu umístíte do stojánku, odstraňte víčko a nechte obsah kolony vykat.



Promytí kolony 25 ml elučního pufru rozdělených do 4 dávek.

Pozn. Eluční pufr: 50 mM Na-fosfát a 50mM NaCl

Náplň kolony Sephadex™ G-25 Medium umožňuje gelovou filtrací oddělit nenavázanou fluorescenční značku od proteinu podle rozdílné velikosti a molekulové hmotnosti.



Opatrně naneste reakční směs Alexa488 s proteinem po 1 hodině inkubace pipetou do středu kolony. Použijte 100 µl elučního pufru k vypláchnutí mikrozkumavky s reakční směsí a opět naneste na kolonu. Roztok nechte zaputovat do kolony.



Eluční pufr přidávejte do kolony po 1 ml.

Postupně jímejte frakce vytékající z kolony do mikrozkumavek po 1 ml. Po cca 2-3 ml začíná vytékat značený protein. Značený protein je obsažen v 1-2 ml vytékajícího elučního pufru.



Značený protein odpipetujte do ultrafiltrační zkumavky (Amicon Ultra, 10K, Millipore) a zakonzentrujte na ~ 100 µL centrifugací na centrifuze s vykývným rotorem (4000 g, 20 min, 4°C)

Stanovte koncentraci značeného proteinu za použití Bradfordové reakce. Určete jaké poměrné množství proteinu bylo naznačeno ve srovnání s množstvím proteinu vstupujícího do reakce s fluoroforem.