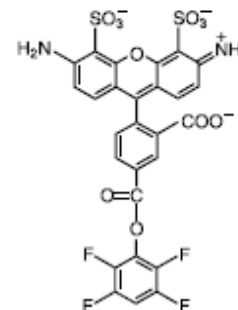


Fluorescenční značení proteinu

Fluorescenční značení proteinu bude provedeno za použití soupravy Alexa Fluor 488 Protei 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 v mikrozkušavce s magnetickým míchadlem
- Roztok proteinu (2 mg/mL) ve fosfátovém pufru
- Mirokyvety (1.8 mL)
- 1M roztok hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO₃, MW = 84), 1mL
- 8 mL sorbentu pro purifikaci proteinu (Biogel P 30 Fine, BioRad)
- Plastová kolona
- Plastová nálevka
- Pěnový držák kolony
- Plastová pipeta na jedno použití

Značení proteinu

Připravte 1M roztok NaHCO₃ rozpuštěním 84 mg 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).

Jestliže je koncentrace proteinu vyšší než 2 mg/mL, nařed'te roztok přidáním fosfátového pufru nebo 0.1 M NaHCO₃.

Do 100 μL roztoku proteinu o koncentraci 2 mg/mL přidejte 10 μL 1M NaHCO₃

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

Nechte zkumavku s fluorescenční značkou zahřát na laboratorní teplotu.

Odpipetujte 10 μL značky rozpuštěné v 0.1M NaHCO_3 smíchejte s roztokem proteinu (pipetováním nahoru a dolů) a vše nechte míchat v mikrozkuhavce s magnetickým míchadlem po dobu 1 h při laboratorní teplotě.

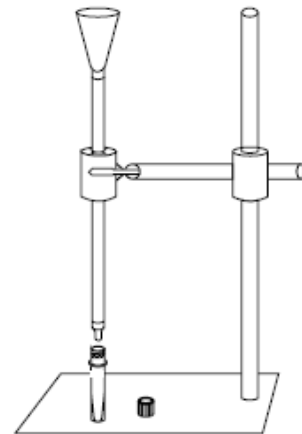
Asi 20 min před koncem inkubace připravte kolonu pro separaci proteinu a nenávané fluorescenční sondy.

Purifikace proteinu

Sestavte kolonu podle Obr. 2. Nálevku nasad'te na horní část kolony. Jemně vsuňte kolonu do pěnového držáku tak, aby byla lehce vychýlena z vertikální polohy. Toto umístění ulehčí plnění kolony. Opatrně odstraňte zátku z dolního konce kolony.

Připravte eluční pufr naředěním 0.8 mL 10X koncentrovaného elučního roztoku (Component D soupravy) naředěním vodou do celkového objem 8 mL.

Pozn. 10X eluční pufr obsahuje 1.5 M NaCl, 0.1 M fosfát sodný, pH 7.2 a 2 mM azid sodný. 10X eluční pufr by se měl před použitím zahřát na laboratorní teplotu, aby došlo k jeho úplnému rozpuštění.



Obr. 2. Sestavení kolony

Za použití plastové pipety řádně zamíchejte purifikační sorbent (Component C) aby se vytvořila homogenní suspenze. Po kapkách pipetou naplňte kolonu tak, že necháte náplň pomalu klouzat do spodní části kolony. Přebytečný pufr při plnění nechte odkapat do kádinky. Naplňte kolonu až do výšky asi 1 cm pod horním okrajem.

Náplň kolony je BioGel P-30 fine (BioRad) pro chromatografické dělení látek s rozdílnou velikostí a molekulovou hmotností. Tato náplň umožňuje gelovou filtrací oddělit nenávanou fluorescenční značku od proteinu.

Při odkapání nadbytečného pufru se přesvědčte, že průtok pufru kolonou nekolísá a je plynulý. V případě velmi pomalého nebo kolísavého průtoku přeplňte kolonu. Kolona zůstává hydratovaná i v případě, že v její horní části není přítomen pufr.

Odstraňte nálevku z horní části kolony. Opatrně naneste reakční směs Alexa488 s proteinem po 1 hodině inkubace pipetou do středu kolony. Použijte 50 μL elučního pufru k vypláchnutí mikrozkuhavky s reakční směsí a opět naneste na kolonu. Roztok nechte zaputovat do kolony.

Nasad'te nálevku zpět na kolonu. Pomalu přilejte do nálevky celý objem připraveného elučního pufru tak, aby se nenarušil povrch sorbentu na vstupu kolony.

Postupně jímejte frakce vytékající z kolony do mikrozkuhovek po 1 mL. Po cca 3 mL začíná vytékat značený protein. Značený protein je obsažen asi v 1 mL vytékajícího elučního pufru.

Značený protein přeneste do ultrafiltrční zkumavky (Amicon Ultra, 10K, Millipore) a nařed'te do 4 mL roztokem 200 mM Na Cl, 50 mM fosfát sodný, pH 7.0

Značený protein zakonzentrujte na ~ 100 μ L centrifugací na centrifuze s vykývným rotorem (5000 rpm, 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.