

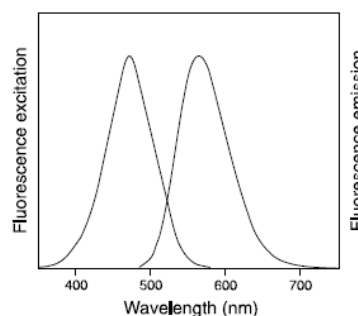
Fluorescenční určení koncentrace proteinu

Určení koncentrace proteinu je nezbytným krokem při analýze biologického materiálu a je součástí mnoha laboratorních protokolů. Citlivost nejčastěji používané Bradfordové metody, která se prakticky pohybuje od 0.1 do 1 mg/mL, je mnohdy nedostatečná. Pro určení koncentrace roztoku proteinu lze s výhodou použít fluorescenční sondu **NanoOrange**. Pomocí NanoOrange lze bezpečně určit koncentraci roztoku proteinu v rozsahu **0.1 – 10 µg/mL**.

Fluorescenční sonda NanoOrange vykazuje nízkou intenzitu fluorescence ve vodném roztoku. Po její vazbě na molekulu proteinu dochází k výraznému zvýšení intenzity fluorescence. NanoOrange má excitační maximum kolem 470 nm a emituje v oblasti 550 nm.

Materiál

- 500X Roztok NanoOrange v DMSO (NanoOrange Protein Quantitation reagent, Molecular Probes, Invitrogen)
- 10X reakční pufr (dilucent)
- Roztok BSA - hovězí sérový albumin (2 mg/mL)
- Spektrofluorometr
- Mírokyveta (1.5 mL)
- Termoblok pro zahřátí na 95°C



Příprava roztoků

Upozornění

Zásobní roztok NanoOrange obsahuje DMSO a musí s ním být nakládáno opatrně, protože DMSO usnadňuje průnik organických molekul do tkání.

1X NanoOrange roztok

Naředit 1.5 ml 10x reakčního pufru do 13.5 mL vody. Přidejte 30 µL 500X zásobního roztoku NanoOrange. Chránit před světlem. Použitelnost roztoku je několik hodin.

Standardní roztok BSA

Připravit 10µg/mL roztok BSA (objem 2mL) v 1X NanoOrange roztoku.

Ve 2 mL mikrozkušavce 200X naředit zásobní roztok BSA (2mg/mL) v NanoOrange roztoku a promíchat.

Vytvoření standardní křivky

Naředit standardní roztok BSA 1X NanoOrange roztokem na koncentrace od 6 do 0.1 µg/mL do mikrozkušavek podle tabulky.

Výsledná koncentrace BSA (µg/mL)	Objem 10 µg/mL standardního roztoku BSA (µL)	Objem 1X roztoku NanoOrange (µL)
6.0	900	600
3.0	450	1050
1.0	150	1350
0.6	90	1410
0.3	45	1455
0.1	15	1485

Příprava neznámého vzorku

1. Nařed'te 30 μL neznámého vzorku v 1470 μL 1X NanoOrange roztoku (50X zředěno) ve 2mL mikrozkuhavce.
2. Nařed'te 15 μL neznámého vzorku v 1485 μL 1X NanoOrange roztoku (100X zředěno) ve 2mL mikrozkuhavce.

Poznámka: Objem neznámého přidávaného vzorku by neměl přesáhnout 4% celkového objemu, aby nedocházelo k ovlivnění intenzity fluorescence NanoOrange složkami pufru.

Denaturace

1. Inkubovat standardy BSA i neznámé vzorky na 95°C po dobu 10 minut v termobloku ve tmě.
2. Nechat vychladnout na pokojovou teplotu v plastovém stojánku ve tmě.
3. Po vychladnutí promíchat a stočit v centrifuze, aby se na víčku kondenzovaná voda vrátila zpět do roztoku.

Měření fluorescence

1. Zapněte spektrofluorometr podle návodu.
2. Změřte intenzitu fluorescence
 - v módu **Single point** při $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$, šířka štěrbin (slits) 2nm/2nm, integrační čas 5 s (Fluoromax)
 - v módu **Read** při $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$, šířka štěrbin (slits) 10nm/10nm, integrační čas 5 s (LS50)
 - současně kromě módu **Read** lze měřit na spektrofluorometru LS50 v módu **Concentration**, který umožňuje přímé vyhodnocení a určení koncentrace neznámého vzorku
3. Změřte nejdříve intenzitu fluorescence blanku, následně standardy.
4. Hodnoty intenzity zapište do tabulky a vynesete do grafu hodnoty intenzity fluorescence standardů po odečtení hodnoty blanku.
5. Změřte intenzitu fluorescence pro obě ředění neznámého vzorku.
6. Po odečtení intenzity blanku určete podle standardní křivky koncentraci DNA v neznámém vzorku.

Výsledky

Stanovení koncentrace proteinu neznámého vzorku.