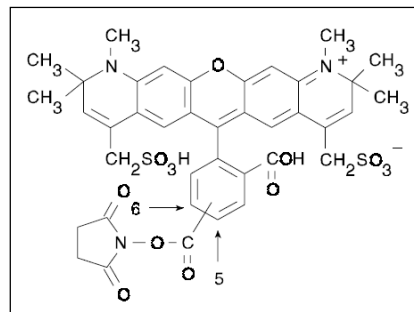


## Fluorescenční značení proteinu

Fluorescenční značení proteinu bude provedeno za použití soupravy Alexa Fluor 594 Protein Labeling Kit. Proteiny značené tímto fluoroforem vykazují excitační maximum 590 nm a emisní maximum 617 nm. Alexa Fluor 594 je ve formě NHS (sukcinimidyl) esteru viz Obr. 1. Za použití následujícího postupu lze fluorescenčně naznačit 0.1 až 1 mg proteinu.



Obr. 1 Alexa Fluor 594

### Příprava proteinu

Pro optimální efektivitu značení by měl být protein ve fosfátovém pufru bez amonných inontů 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 594
- Mikrozkušavka s magnetickým míchadlem
- Roztok proteinu ve fosfátovém pufru (TRF2, MW = 59 135,  $\epsilon = 50545 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , zásobní koncentrace 4.5 mg/ml)
- 1M roztok hydrogenuhličitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ , MW = 84), 1ml
- Fosfátový pufr (50 mM NaCl, 50 mM fosfát sodný)
- Kolona s náplní Sephadex G-25
- Kyvety
- NanoPhotometer (Implen)

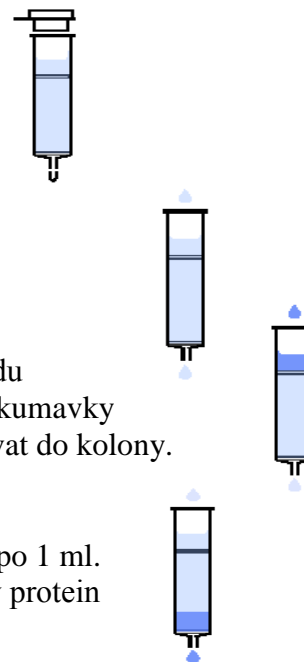
### Značení proteinu

1. Do mikrokyvety napipetujte 166  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu ( $c = 4.5 \text{ mg/ml}$ ). Roztok nařeďte přidáním fosfátového pufru na výslednou koncentraci 2 mg/ml.
2. Zkušavky s fluorescenční značkou nechte zahřát na laboratorní teplotu. Přidejte 40  $\mu\text{l}$  1M  $\text{NaHCO}_3$  do každé zkušavky a promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Odpipetujte roztok fluoroforu do mikrozkumavky s proteinem a promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
3. Vše nechte míchat v mikrozkumavce s magnetickým míchadlem po dobu 30 minut při laboratorní teplotě.
4. 5-10 minut před koncem inkubace připravte kolonu pro separaci proteinu a nenavázané fluorescenční značky.

## Purifikace proteinu

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

1. Kolonu umístěte do stojánku, odstraňte víčko a zátku a nechte obsah kolony vykat.
2. Promyjte kolonu 5 ml fosfátového pufru.
3. Opatrně naneste reakční směs proteinu a značky pipetou do středu kolony. Použijte 100  $\mu$ l fosfátového pufru k vypláchnutí mikrozkuřavky s reakční směsí a opět naneste na kolonu. Roztok nechte zaputovat do kolony.
4. Po 1 ml přidávejte fosfátový pufr. Postupně jímejte frakce vytékající z kolony do mikrozkuřavek po 1 ml. Po cca 2-3 ml začíná vytékat značený protein. Zachyťte značený protein do **jedné** frakce.
5. Vzorek (frakci se zachyceným značeným proteinem) proměřte na spektrofotometru. Na základě absorpčního spektra určete, jaké množství proteinu bylo naznačeno a jaký je stupeň značení.



## Nastavení spektrofotometru:

**Functions** – **Wave scan** – interval vlnových délek (260-600 nm) – vložte kyvetu s blankem – **Blank** – vložte kyvetu se vzorkem – **Sample**  
**Options** – **Graph scale** – upravit rozsah osy y, aby byla maxima spektra dobře viditelná

## Určení koncentrace proteinu v mg/ mL

$$A_{\text{protein}} = A_{280} - A_{594} * CF$$

$$CF = \frac{A_{280 \text{ volné značky}}}{A_{594 \text{ volné značky}}}; CF \text{ je korekční faktor udávající příspěvek značky k absorpčnímu spektru}$$

## Výpočet stupně značení proteinu

$$\text{stupeň značení} = \frac{A_{594} \times MW_{\text{protein}}}{c_{\text{protein}} \times \epsilon_{594}}$$

$$\text{st. značení} = \frac{\text{molární množství značky}}{\text{molární množství proteinu}} = \frac{\text{koncentrace značky}}{\text{koncentrace proteinu}} = \frac{\frac{A_{594}}{\epsilon_{594}}}{\frac{c_{\text{prot}}}{MW_{\text{protein}}}}$$

kde  $\epsilon_{594} = 73000$  je molární extinkční koeficient značky Alexa Fluor 594 při 594 nm,  $c$  je koncentrace proteinu v mg/mL a  $MW$  je molekulová hmotnost proteinu

**Výsledky** Získané množství proteinu a stupeň značení.