

## Úkoly

### List BCA-Cviceni (datum vaší skupiny)

- 1) Vypočítat rovnici kalibrační přímky ředění standardu BSA
- 2) Vypočítat koncentrace stanovovaných vzorků
- 3) Vypočítat objem vzorku nutný pro nanesení 15 ug proteinů na gel

### List MAPK-Western blot & přiložené \*.tif soubory

- 4) Provést denzitometrickou analýzu výsledků Western blotu MAPK pERK1/2 (fosfo-ERK1) a MAPK ER  
- k analýze použít přiložené soubory "phosphoERK.tif" a "totalERK.tif"  
- anotace obrázků a postup analýzy pomocí ImageJ viz list MAPK-Western blot  
- do tabulky dosadit výsledky z ImageJ => vypočítat relativní denzitu a normalizovanou denzitu

Poznámka: Excelové buňky se zeleným stínováním jsou ty, které je potřeba vyplnit

## Otázky & Odpovědi

	Jméno	
	Datum cvičení	
	Číslo vzorku	
1)	Směrnice kalibrační přímky BSA?	
2)	Intercept kalibrační přímky BSA?	
3)	Koncentrace proteinů v neředěném vzorku	mg/mL
	směrodatná odchylka:	
	koeficient variance:	
4)	Objem vzorku obsahující 15 ug proteinu?	uL
5)	Kolikrát se u buněk ošetřených TPA zvýšil podíl fosforylované varianty MAPK ERK1 oproti kc	
6)	Kolikrát se u buněk ošetřených TPA zvýšil podíl fosforylované varianty MAPK ERK2 oproti kc	
7)	Jaká konkrétní fosfomísta MAPK ERK1/2 byla v tomto experimentu hodnocena (typ aminokyseliny)	
	ERK1:	
	ERK2:	



K1/2 (celkový ERK)



ontrola (při normalizaci na celkové množství MAPK ERK1 ve vzorku)?

ontrola (při normalizaci na celkové množství MAPK ERK2 ve vzorku)?

Residua zbytku a jeho pořadí v peptidovém řetězci)?

## Popis desky

Plate Title Standard BSA (uvedny jsou koncentrace zásobních roztoků - není zohledněno ředění 3/4 před testem!)

	Vzorky				Vzorky			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A		0.000			vzorek1			vzorek9
B		0.250			vzorek2			
C		0.500			vzorek3			
D		0.750			vzorek4			
E		1.000			vzorek5			
F		1.500			vzorek6			
G		2.000			vzorek7			
H		2.500			vzorek8			

## Výsledky měření

Prompt #1:

ReadingDate:	11/3/2014	ReaderName:	PowerWave
ReadingTime:	10:01:09	SoftwareVersion:	Ver 3.4 Rev 21
DataFileName:	NewPlate	ProtocolFileName:	BCA.prt
ReadingType:	Reader	LagTime:	0:00:00
ReadMode:	Normal	PreHeating:	No
Filter1:	562 nm	ShakingIntensity:	1
ReadingZone:	A1-H12	ShakingDuration:	10 s

červené hodnoty - odlehlé,

nezapadají do trendu, doporučuji ignorovat

oranžové hodnoty - jeví se jako odlehlé vůči ostatním opakovaným vzorkům, doporučuji ignorovat

Plate Title

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.298	0.268	0.241	0.510	0.523	0.509	0.587	0.580
B	0.324	0.312	0.297	0.824	0.527	0.340	0.030	0.029
C	0.364	0.375	0.358	0.251	0.259	0.253	0.031	0.030
D	0.336	0.278	0.273	0.551	0.570	0.550	0.033	0.031
E	0.339	0.372	0.374	0.686	0.562	0.513	0.032	0.031
F	0.367	0.396	0.414	0.833	0.601	0.431	0.032	0.038
G	0.406	0.413	0.426	0.442	0.480	0.482	0.031	0.032
H	0.476	0.475	0.474	0.721	0.519	0.327	0.030	0.032

## Vyhodnocení

c stdu BSA (mg/mL)	Ředění	Finální c stdu BSA (mg/mL)	A1	A2	A3	Průměr A	SD	Cv%
0.0 (Blank)	0.75	0						
0.25	0.75	0.188						
0.5	0.75	0.375						
0.75	0.75	0.563						
1	0.75	0.75						
1.5	0.75	1.125						
2	0.75	1.5						
2.5	0.75	1.875						

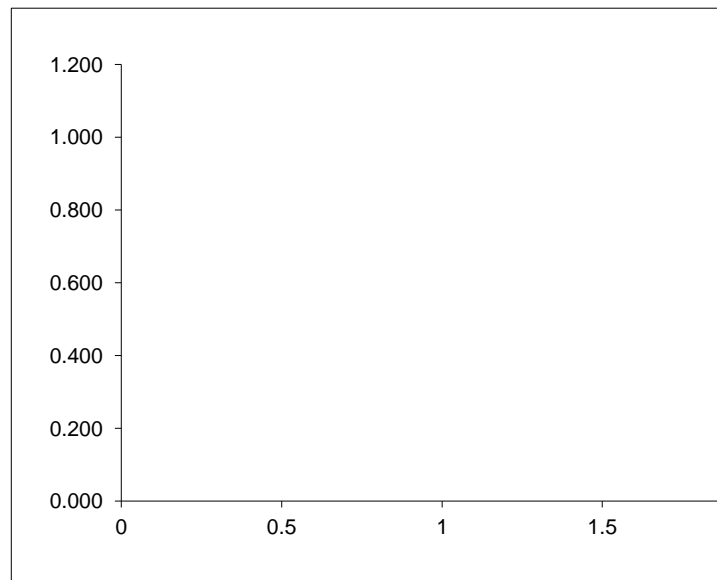


9	10	11	12

váním nebo


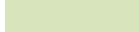
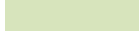
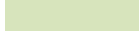
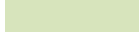
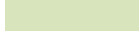
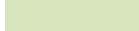
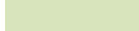
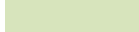
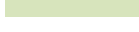
9	10	11	12
0.566	0.031	0.031	0.032
0.029	0.028	0.029	0.030
0.030	0.031	0.031	0.030
0.032	0.031	0.030	0.035
0.030	0.033	0.032	0.032
0.028	0.035	0.034	0.032
0.034	0.034	0.033	0.031
0.036	0.033	0.030	0.031

562

SD	Cv%

Objem (neředěného) vzorku obsahující  
15 ug proteinu:

-  uL
-  uL
-  uL
-  uL
-  uL
-  uL
-  uL
-  uL
-  uL
-  uL

◆ R..  
— Li..





## Popis desky

Plate Title Standard BSA (uvedeny jsou koncentrace zásobních roztoků - není zohledněno ředění 3/4 před testem!)

	Vzorky				Vzorky			
	1	2	3	4	5	6	7	8
A		2.500			vzorek1			vzorek9
B		2.000			vzorek2			
C		1.500			vzorek3			
D		1.000			vzorek4			
E		0.750			vzorek5			
F		0.500			vzorek6			
G		0.250			vzorek7			
H		0.000			vzorek8			

## Výsledky měření

Prompt #1:

ReadingDate:	11/7/2014	ReaderName:	PowerWave
ReadingTime:	14:36:55	SoftwareVersion:	Ver 3.4 Rev 21
DataFileName:	107-proteiny_cviko.pla	ProtocolFileName:	NewProtocol
ReadingType:	Reader	LagTime:	0:00:00
ReadMode:	Normal	PreHeating:	No
Filter1:	562 nm	ShakingIntensity:	#N/A
ReadingZone:	A1-H12	ShakingDuration:	#N/A s

Plate Title

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.885	0.902	0.941	0.457	0.456	0.458	0.3	0.315
B	0.751	0.793	0.827	0.482	0.496	0.513	0.089	0.095
C	0.634	0.656	0.689	0.388	0.416	0.42	0.09	0.091
D	0.53	0.523	0.571	0.466	0.498	0.465	0.033	0.032
E	0.404	0.422	0.46	0.497	0.481	0.491	0.032	0.033
F	0.334	0.346	0.362	0.435	0.441	0.441	0.027	0.041
G	0.228	0.248	0.251	0.498	0.484	0.506	0.026	0.035
H	0.151	0.143	0.134	0.463	0.397	0.474	0.03	0.04

## Vyhodnocení

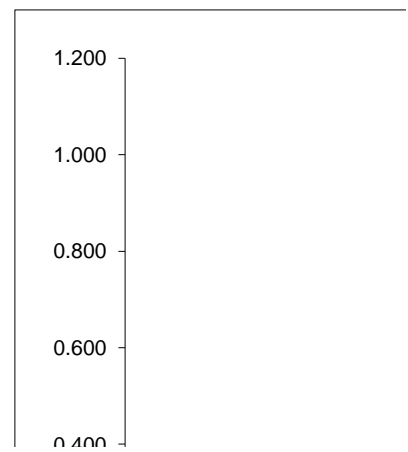
c stdu BSA (mg/mL)	Ředění	Finální c stdu BSA (mg/mL)	A1	A2	A3	Průměr A	SD	Cv%
0.0 (Blank)	0.75	0						
0.25	0.75	0.188						
0.5	0.75	0.375						
0.75	0.75	0.563						
1	0.75	0.75						
1.5	0.75	1.125						
2	0.75	1.5						
2.5	0.75	1.875						
Kalibrační přímka: A(562nm) = SLOPE * c (mg/mL) + INTERCEPT								
SLOPE (Směrnice):						#DIV/0!		



9	10	11	12

9	10	11	12
0.336	0.03	0.033	0.033
0.092	0.029	0.031	0.031
0.095	0.03	0.031	0.032
0.036	0.032	0.032	0.036
0.03	0.033	0.033	0.031
0.031	0.034	0.033	0.03
0.032	0.038	0.035	0.031
0.031	0.035	0.035	0.027

562

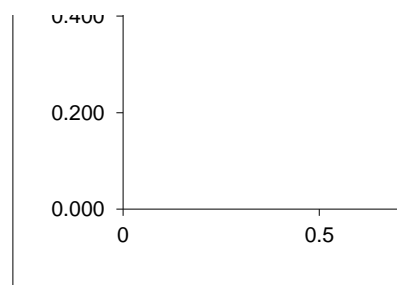



SD		Cv%

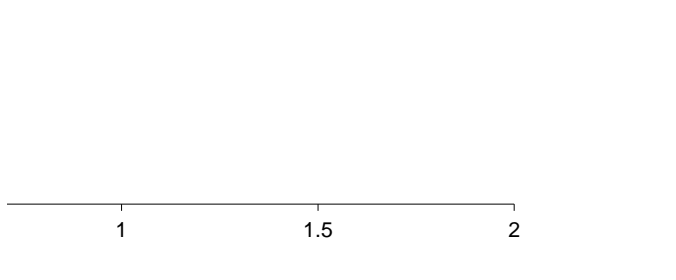
Objem (neředěného) vzorku obsahující

15 ug proteinu:

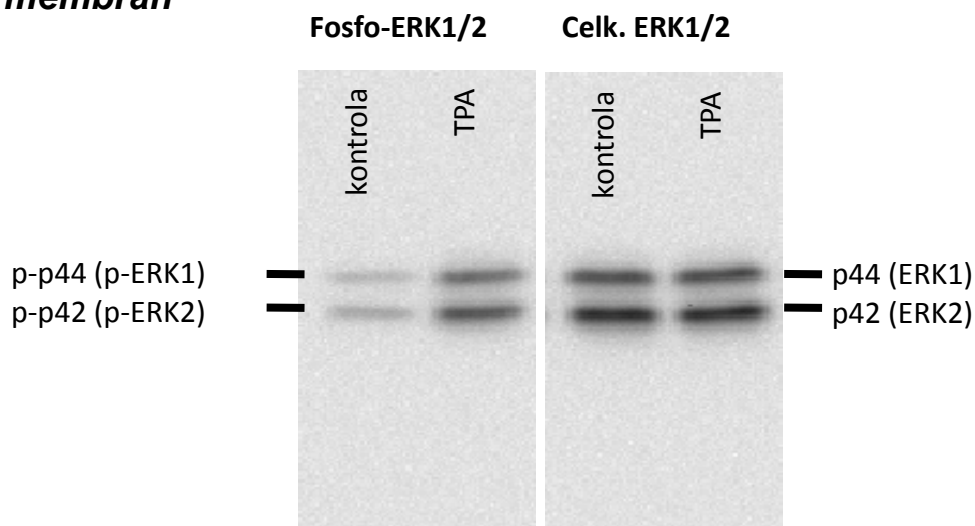
uL
uL
uL
uL
uL
uL
uL
uL
uL
uL



◆ R..  
— Li..



## Popis membrán



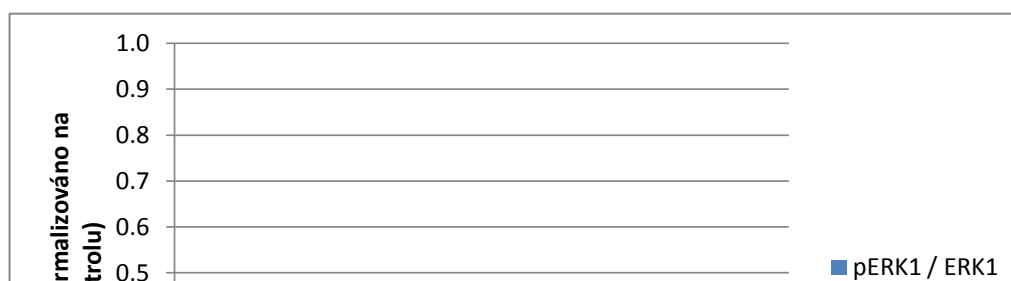
Western blotting kontrolních TM3 buněk vs. buněk exponovaných chemikálií s nádorově promočnými účinky, 12-O-Tetradekanoylforbol-13-acetát (TPA, 10 nM, 30 min). Metodou Western blot byla detekována aktivovaná (fosforylovaná) forma MAP kinázy ERK1/2 (pomocí primární protilátky Cell Signaling, 4370S) a celková (fosforylovaná i nefosforylovaná) forma MAP kinázy ERK1/2 (detekováno pomocí primární protilátky Cell Signaling, 4695S)

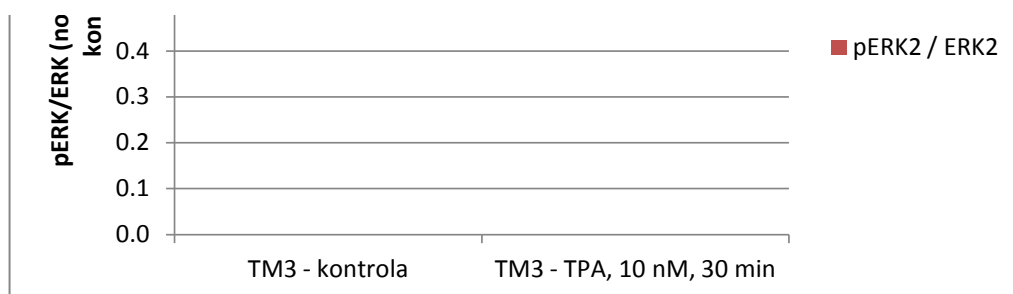
## Vyhodnocení

	Denzita				Rel
	Fosfo-ERK (pERK)		Celkový ERK (ERK)		RD [p
	pERK1	pERK2	ERK1	ERK2	RD [pERK1]
TM3 - kontrola					#DIV/0!
TM3 - TPA, 10 nM, 30 min					#DIV/0!

Relativní denzita - srovnání denzity proužků vůči kontrole (kontrola = 1.00)

Normalizovaná denzita - srovnání relativní denzity proužku zájmového proteinu v příslušném vzorku s re. (v tomto experimentu šlo o zhodnocení podílu fosforylované MAPK ERK1/2 vůči celkovému množství ERK1/2)



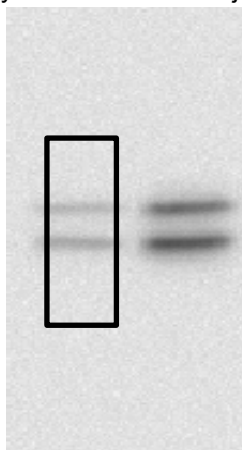


## Postup: Denzitometrická analýza pomocí programu ImageJ

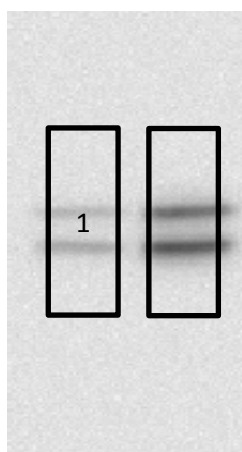
ke stažení =>

<http://imagej.nih.gov/ij/>

- 1) Otevřít obrázek s analyzovanými / srovnávanými bandy - phosphoERK.tif
- 2) Vybrat na liště nástrojů "Rectangular selection" a vytvořit obdélník ohraničující bandy pERK1/2 v konti

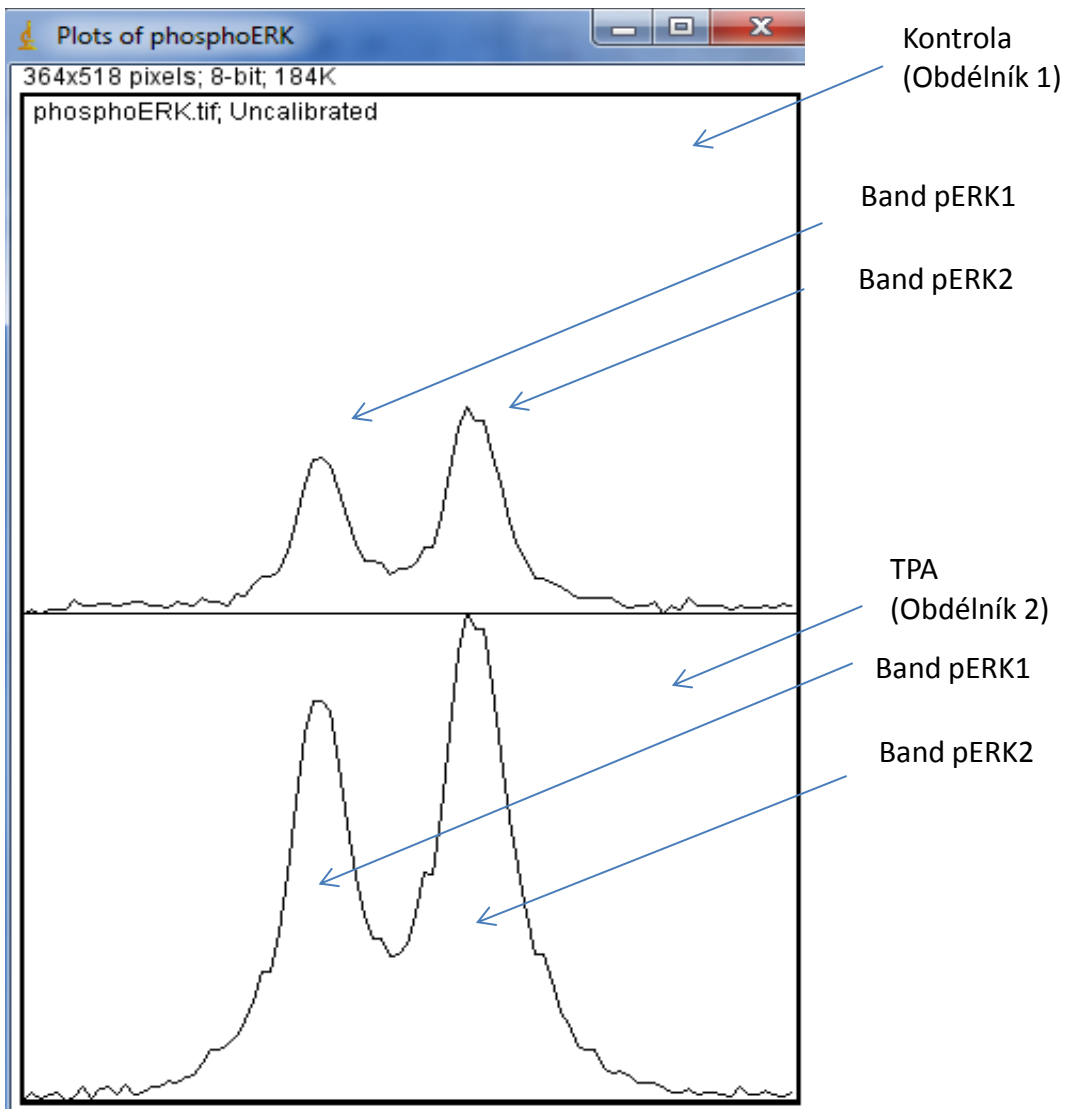


- 3) Stisknout Ctrl+1 (v obdélníku se objeví číslovka 1)
- 4) Přetáhnout pomocí myši vytvořený obdélník č. 1 na místo ohraničující bandy vzorku "TPA"

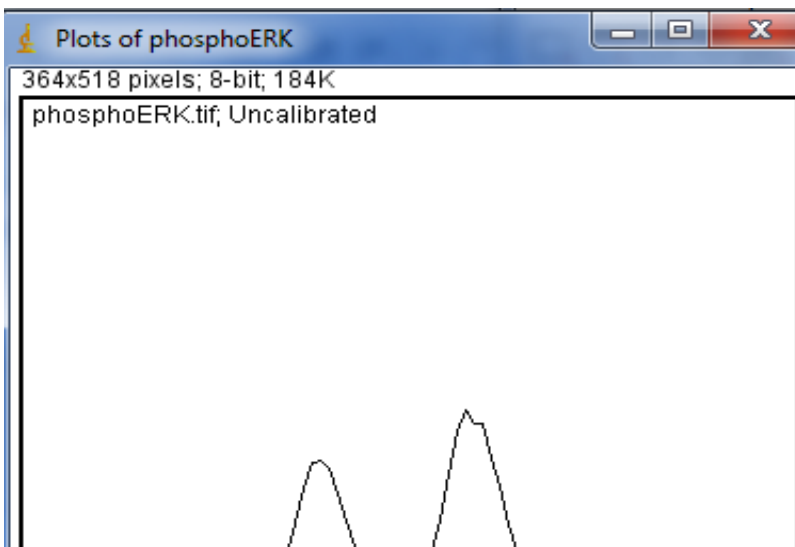


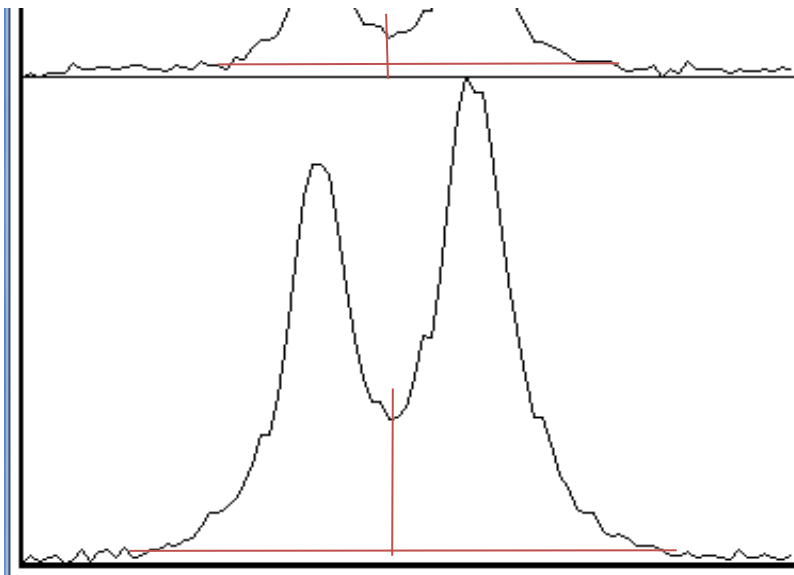
- 5) Stisknout Ctrl+2 (v druhém obdélníku se objeví číslovka 2)
  - 6) Stisknout Ctrl+3
  - 7) Objeví se denzitometrický profil vzorků - píky odpovídají profilu intenzity signálu jednotlivých bandů
-





- 8) Vybrat na liště nástrojů "(Straight) Line selection" a:
- označit základní linii píků
  - rozdělit dvojici píků svislou čarou vedenou dnem údolí mezi píky





- 9) Vybrat na liště nástrojů "Wand (Tracing) Tool"
- 10) Kliknout "Wand" hůlkou postupně doprostřed jednotlivých píků (hranice píku se zvýrazní)
- 11) V nabídce "Analyze" vybrat "Gels" a následně kliknout na "Label Peaks"
- 12) Objeví se tabulka s hodnotami plochy píků ("Area") a jejich relativní velikosti vůči celkové ploše ("Percent")
- 13) (POZNÁMKA: pořadí hodnot v tabulce odpovídá pořadí, v jakém byly píky vybrány pomocí "Wand" hůlky)
- 14) Obrázky s píky s hodnotami vložte prosím sem (použít v ImageJ funkci "Copy To System" v záložce)
- 14) Hodnoty "AREA" nebo "Percent" dosadit do tabulky na začátku tohoto souboru  
=> vypočte se relativní denzita bandů
- 15) Celý postup opakovat s obrázkem celkového ERK1/2, tzn. totalERK1/2.tif  
=> proběhne normalizace relativních denzit podle denzity neovlivněného proteinu (v tomto případě total

**PODROBNOSTI viz**

<http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>

(obrázek s píky prosím vložit sem)

lativní Denzita (vůči kontrole)			Normalizovaná denzita (vůči neovlivněnému proteinu)	
[ERK]	RD [ERK]		pERK1 / ERK1	pERK2 / ERK2
RD [pERK2]	RD [ERK1]	RD [ERK2]		
#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

*lativní denzitou proužku neovlivněného proteinu (např. protein kontroly nanášení - house-keeping, nebo v naše 'K1/2, které by nemělo být krátkodobou expozicí TPA prakticky ovlivněno, proto jsou hodnoty pERK normalizov*

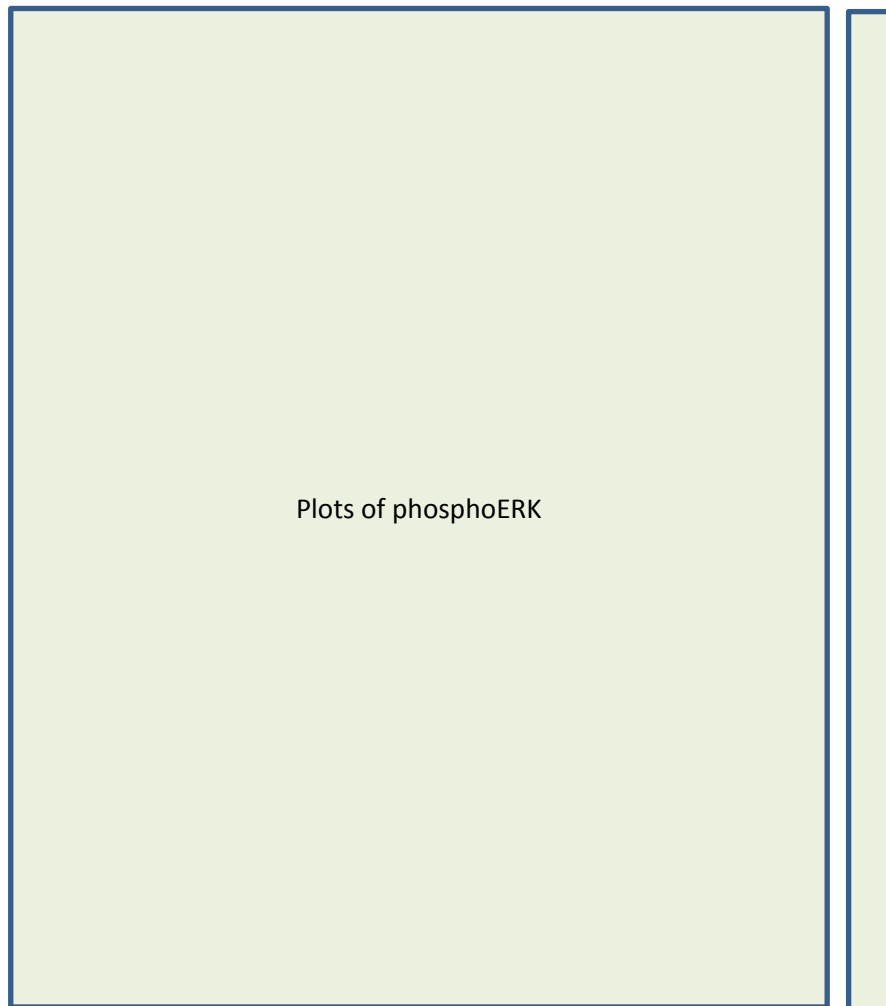
rolním vzorku



percent")  
)  
"Edit", pak Ctrl+V)



ERK)



*m případě celková MAPK ERK1/2)  
'ány na celkový ERK)*





