

ÚLOHA č. 2

Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody

Chemikálie:

- **BCA Protein Assay Kit** (Pierce / Thermo, Cat# 23225)

- rozsah stanovovaných koncentrací je 0,125-2 mg/mL
- Reagent A a Reagent B, jejich smíchaním v poměru 50 dílů reagenta A a 1 díl reagenta B vznikne **Reagent A:B**, spotřeba **3x200 uL** na každý vzorek (blank, standard BSA, neznámý) + rezerva

- **MilliQ H2O a lyzační pufr** použitý pro extrakci proteinů

- **vzorky** (např. homogenizovaný buněčný lyzát):

- spotřeba $3 \times 10 \text{ uL} + 10 \text{ uL}$ (rezerva) = 40 uL

- vzorky je vhodné naředit:

- při použití misky 9 cm^2 , 150 uL lyzačního pufru a předpokládaném výtěžku extrakce $30-60 \text{ ug proteinu/cm}^2$:

$$(9 \text{ cm}^2 \times 30 \text{ ug/cm}^2) / 150 \text{ uL} = 1.8 \text{ mg/mL}$$

$$(9 \text{ cm}^2 \times 60 \text{ ug/cm}^2) / 150 \text{ uL} = 3.6 \text{ mg/mL}$$

=> očekávaná koncentrace proteinů ve vzorku velmi pravděpodobně překročí koncentrační rozsah metody

- snížení koncentrace složek lyzačního pufru, které mohou interferovat s metodou stanovení (zkontrolovat tabulku kompatibility!)

- úspora vzorku

- **sada kalibračních roztoků BSA** (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/mL, rozpuštěno v MilliQ H2O)

- spotřeba $3 \times 10 \text{ uL} + 10 \text{ uL}$ (rezerva) = 40 uL

- kalibrační standard ve vodě je vhodné naředit lyzačním pufrem tak, aby podíl lyzačního pufru ve vzorcích standardu odpovídal podílu lyzačního pufru v neznámých vzorcích nařazených pro stanovení

Pomůcky:

- 1.5 mL mikrozkumavky, stojánek, 15 mL centrifugační zkumavka

- automatické pipety (2-20 uL, 20-200 uL, 100-1000 uL)

- multikanálová pipeta 100-300 uL, rezervoár pro multikanálovou pipetu

- 96j PS mikrotitrační deska

- vortex, minicentrifuga, třepačka na mikrotitrační desky

- mikrodestičkový spektrofotometr

Postup:

1) Ředění vzorků:

- ředit vodou v poměru 1:4 (tzn. 1 díl vzorku a 3 díly vody, ředící faktor 0,25)

=> vzorky budou zředěny 4x

- do mikrozkumavky napipetovat **30 uL vody** a přidat **10 uL buněčného lyzátku**

- krátce vortexovat a následně stočit

2) Ředění standardů:

- ředit vodou v poměru 3:4 (tzn. 3 díly roztoku standardu a 1 díl lyzačního pufru, ředící faktor 0,75)

=> standardy budou zředěny 1,33x

- Slepý vzorek (BLANK): do mikrozkumavky napipetovat **30 uL roztoku MilliQ vody** a přidat **10 uL lyzačního pufru**

- Standardy BSA: do mikrozkumavky napipetovat **30 uL roztoku standardu BSA** o příslušné koncentraci (0,25-2,5 mg/mL) a přidat **10 uL lyzačního pufru**

- krátce vortexovat a následně stočit

3) Příprava BCA reagencií:

- připravit Reagent A:B (míchat v poměru 50 dílů Reagenta A a 1 díl Reagenta B):

([blank + počet standardů BSA + počet neznámých vzorků] x 3 x 200 µL) + 700 µL (rezerva)

Příklad: $((1 + 7 + 10) \times 3 \times 200) + 700 = 11500 \text{ }\mu\text{L}$

$$11500 \text{ } \mu\text{L} / 50 = 230 \text{ } \mu\text{L}$$

=> Napipetovat 11500 μ L Reagentu A a přidat 230 μ L Reagentu B => 11730 μ L Reagentu A:B

3) Provedení BCA stanovení

- 3.1) Do mikrodestičky napipetovat ve **třech opakováních po 10 μ L:**

- blank
 - BSA standardy
 - neznámé vzorky

- 3.2) Přidat 200 μ L Reagentu A:B do jamek se vzorky (pomocí multikanálové pipety)

- 3.3) Promíchat na třepačce 1 min

- 3.4) Inkubovat 30 min při 37°C

- 3.5) Změřit absorbanci při 562 nm

4) Výpočet koncentrace proteinů

Kalibrační přímka: $A(562\text{nm}) = \text{SLOPE} * c (\text{mg/mL}) + \text{INTERCEPT}$

SLOPE (Směrnice):

Intercept: