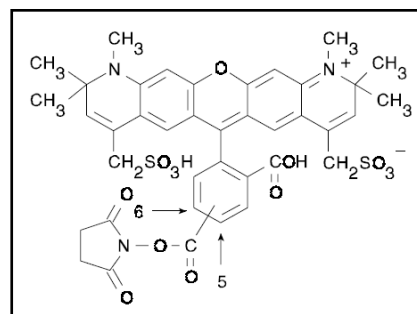


## Fluorescenční značení proteinu

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 AlexaFluor 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 (Thyroglobulin, MW = 669 000, extinkční koeficient  $\epsilon = 353465 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , zásobní koncentrace 10 mg/ml)
- 1M roztok hydrogenuhličitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ , MW = 84), 1 ml
- Fosfátový pufr (50 mM NaCl, 50 mM fosfát sodný)
- Kolona s náplní Sephadex G-25

### Značení proteinu

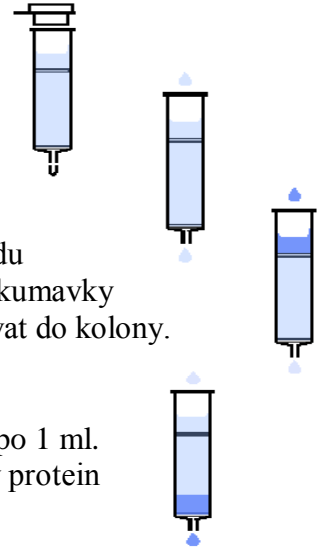
1. Do mikrokyvety napipetujte 50  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu ( $c = 10 \text{ mg/ml}$ ). Jestliže je koncentrace proteinu vyšší než 2 mg/ml, roztok se naředí přidáním fosfátového pufru na výslednou koncentraci 2 mg/ml.
2. (Zkušavku s fluorescenční značkou nechte zahřát na laboratorní teplotu. Přidejte 100  $\mu\text{l}$  1M  $\text{NaHCO}_3$  a promíchejte pipetováním nahoru a dolů.) Odpipetujte 50  $\mu\text{l}$  roztoku fluorescenční barvičky 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.

- 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 nenavázanou fluorescenční značku od proteinu podle rozdílné velikosti a molekulové hmotnosti.

- Kolonu umístěte do stojánku, odstraňte víčko a zátku a nechte obsah kolony vykat.
- Promyjte kolonu 5 ml fosfátového pufru.
- Opatrně naneste reakční směs proteinu a značky pipetou do středu kolony. Použijte 100  $\mu$ l fosfátového pufru k vypláchnutí mikrozkušavky s reakční směsí a opět naneste na kolonu. Roztok nechte zaputovat do kolony.
- Po 1 ml přidávejte fosfátový pufr. Postupně jímejte frakce vytékající z kolony do mikrozkušavek po 1 ml. Po cca 2-3 ml začíná vytékat značený protein. Zachyťte značený protein do jedné frakce.
- 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:

### NanoDrop:

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 byly píky viditelné

### Helios:

Scan – Start (260 nm) – Stop (600 nm) – Bandwidth (2 nm) – Blank – vložte kyvetu s blankem – Zero base – vložte kyvetu se vzorkem – Run  
Manipulate – Track

$$\text{molární množství značky ku molárnímu množství proteinu} = \frac{A_{590} \times \text{ředění}}{73000 \times C_m}$$

kde 73000 je molární extinkční koeficient značky Alexa Fluor 594 při 590 nm a  $C_m$  molární koncentrace proteinu