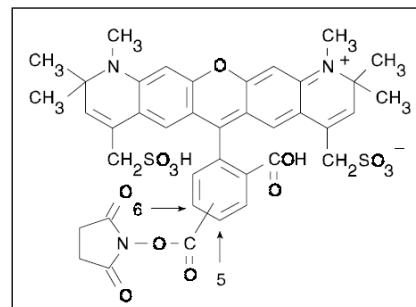


Fluorescenční značení proteinu

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, extinkční koeficient $\epsilon = 50545 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, zásobní koncentrace 8 mg/ml)
- 1M roztok hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3 , MW = 84), 1ml
- Fosfátový pufr (50 mM NaCl, 50 mM fosfát sodný)
- Kolona s náplní Sephadex G-25
- Kyvety
- NanoPhotometer (Implen)

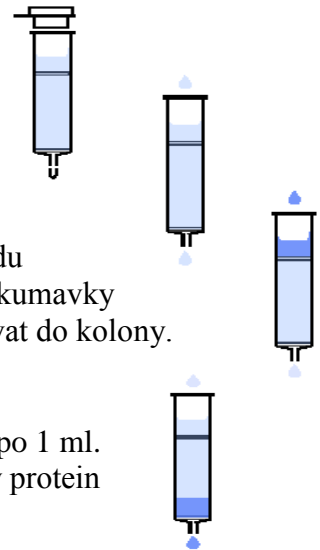
Značení proteinu

1. Do mikrokvyety napipetujte 125 μl roztoku proteinu ($c = 8 \text{ mg/ml}$). Roztok se naředíte přidáním fosfátového pufru na výslednou koncentraci 2 mg/ml.
2. Zkušavky s fluorescenční značkou nechte zahřát na laboratorní teplotu. Přidejte 25 μl 1M NaHCO_3 do každé zkušavky a promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Odpipetujte do mikrozkušavky s proteinem a promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
3. Vše nechte míchat v mikrozkušavce s magnetickým míchadlem po dobu 30 minut při laboratorní teplotě.
4. 5-10 minut před koncem inkubace připravte kolonu pro separaci proteinu a nenávané 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 μ 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 byly píky viditelné

Určení koncentrace protein v mg/ mL

$$A_{\text{protein}} = A_{280} - A_{\text{max}} (\text{CF})$$

$$\text{CF} = \frac{A_{280 \text{ volné značky}}}{A_{\text{max volné značky}}}$$

Výpočet stupně značení

$$\text{st. značení} = \text{molární množství značky ku molárnímu množství proteinu} = \frac{A_{\text{max}} \times \text{MW}}{C \times \epsilon_{\text{značky}}}$$

kde $\epsilon = 73000$ je molární extinkční koeficient značky Alexa Fluor 594 při 590 nm a C koncentrace proteinu v mg/mL

Výsledky

Získané množství proteinu a stupeň značení.