

## Úkoly

### Výpočet koncentrace proteinů ve vzorku na základě kalibrace

- 1) Vypočítat rovnici kalibrační přímky ředění standardu BSA
- 2) Vypočítat koncentrace stanovovaných vzorků
- 3) Vypočítat objem vzorku nutný pro nanesení 10  $\mu\text{g}$  proteinů na gel

### Analýza výsledků Western blotu (list 'MAPK')

- 4) Provést denzitometrickou analýzu výsledků Western blotu MAPK pERK1/2 (fosfo-ERK1) a MAPK ERK2  
- k analýze použít přiložené soubory "phosphoERK" a "totalERK"  
- anotace obrázků a postup analýzy pomocí ImageJ  
- do tabulky dosadit výsledky z ImageJ => vypočítat relativní denzitu a normalizovanou denzitu

## Výsledky a odpovědi

- pozn. buňky označené ŽLUTĚ je třeba vyplnit !!!

Jméno:  Datum cvičení: 2015-30-11

1) Směrnice ("SLOPE") kalibrační přímky BSA:

2) Intercept kalibrační přímky BSA:

3) Koncentrace proteinů v neředěném vzorku, směrodatná odchylka koncentrace, koeficient variace

C [mg/mL] =  SD =

4) Jaký je přídavek lyzačního pufru a LAEMLI (10 $\times$ ) k naředění vašeho vzorku do koncentrace 1 mg/mL

Lyzační pufr [ $\mu\text{L}$ ] =  LAEMLI 10 $\times$  [ $\mu\text{L}$ ] =

5) Kolikrát se u buněk ošetřených TPA zvýšil podíl fosforylované varianty MAPK ERK1 oproti kontrolě

$\times$

6) Kolikrát se u buněk ošetřených TPA zvýšil podíl fosforylované varianty MAPK ERK2 oproti kontrolě

$\times$

7) Jaká konkrétní fosfomísta MAPK ERK1/2 byla v tomto experimentu hodnocena (typ aminokyseliny)

ERK1:  ERK2:

race BSA (list 'BCA-concentration')

MAPK-WesternBlot')

1/2 (celkový ERK)

di

Číslo/označení vzorku:

[redacted]

ance:

KV =

[redacted]

ng/mL (předpokládejte objem vzorku 100 µL):

[redacted]

kontrola (při normalizaci na celkové množství MAPK ERK1 ve vzorku):

kontrola (při normalizaci na celkové množství MAPK ERK2 ve vzorku):

linového zbytku a jeho pořadí v peptidovém řetězci):

96-well microplate LAYOUT

	1	2	3	4	5	6
A		0			5	
B		0.5			s1	
C		1			s2	
D		1.5			s3	
E		2			s4	
F		2.5			s5	
G		3			s6	
H		4				

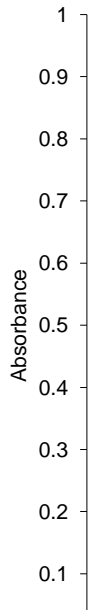
ABSORBANCE 750 nm

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						

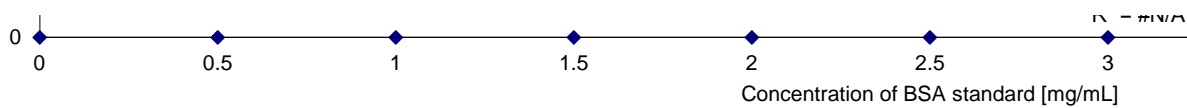
**CALIBRATION CURVE**

BSA [mg/mL]	ABSORBANCE		
0	0	0	0
0.5	0	0	0
1	0	0	0
1.5	0	0	0
2	0	0	0
2.5	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0

1)



$y = 0$   
 $R^2 = \#N/A$



Calibration curve:  $A (750 \text{ nm}) = \text{SLOPE} * c (\text{mg/mL}) +$

**2)**

SAMPLE	ABSORBANCE		
s1	0	0	0
s2	0	0	0
s3	0	0	0
s4	0	0	0
s5	0	0	0
s6	0	0	0

**3)**

CONCENTRATION OF BSA	
THEORETICAL	EXPERIMENTAL
0	#DIV/0! mg/mL
0.5	#DIV/0! mg/mL
1	#DIV/0! mg/mL
1.5	#DIV/0! mg/mL
2	#DIV/0! mg/mL
2.5	#DIV/0! mg/mL
3	#DIV/0! mg/mL
4	#DIV/0! mg/mL
5	#DIV/0! mg/mL

CONCENTRATION OF S	
s1	0.0000
s2	0.0000
s3	0.0000
s4	0.0000
s5	0.0000
s6	0.0000

↑  
**!!! IF GREEN, USE TA**  
**!!! IF RED, USE TABL**

**(1) DILUTING OF SAMPLES FOR WESTERN BLOTTING to 1 mg/mL**

weight of proteins applied onto the gel 10 µg  
 volume of sample(s) applied onto gel using LAEMLI 3× 15 µL **!!! FILL IN !!**  
 volume of sample(s) applied onto gel using LAEMLI 4× 12.5 µL of lysate y  
 volume of sample(s) applied onto gel using LAEMLI 10× 10 µL dilute to

**4)**

SAMPLE	C [mg/mL]	volume of lysate [µL]	add lysis buffer [µL]	add LAEMLI 3× [µL]	(or) add LAEMLI 4× [µL]
s1			0.00	0.00	0.00
s2			0.00	0.00	0.00
s3			0.00	0.00	0.00
s4			0.00	0.00	0.00
s5			0.00	0.00	0.00
s6			0.00	0.00	0.00

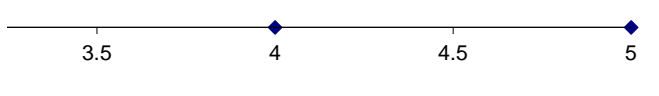
**(2) DILUTING OF SAMPLES FOR WESTERN BLOTTING to 0,5 mg/mL**

weight of proteins applied onto the gel 10 µg  
 volume of sample(s) applied onto gel using LAEMLI 3× 30 µL **!!! FILL IN !!**  
 volume of sample(s) applied onto gel using LAEMLI 4× 25 µL of lysate y  
 volume of sample(s) applied onto gel using LAEMLI 10× 20 µL dilute to 0

SAMPLE	C [mg/mL]	volume of lysate [µL]	lysis buffer	add LAEMLI 3× [µL]	(or) add LAEMLI 4× [µL]
s1	0.0000		0.00	0.00	0.00
s2	0.0000		0.00	0.00	0.00
s3	0.0000		0.00	0.00	0.00

	s4	0.0000		0.00	0.00	0.00
	s5	0.0000		0.00	0.00	0.00
	s6	0.0000		0.00	0.00	0.00





INTERCEPT

MEAN	SD	C [mg/mL]
0		
0		
0		
0		
0		
0		

SAMPLE(S)
mg/mL
mg/mL
mg/mL
mg/mL
mg/mL
mg/mL

**TABLE (1)**

**LINE (2)**

! the volume you want to 1 mg/mL
(or) add LAEMLI 10× [μL]
0.00
0.00
0.00
0.00
0.00
0.00

! the volume you want to 0,5 mg/mL
(or) add LAEMLI 10× [μL]
0.00
0.00
0.00

0.00
0.00
0.00

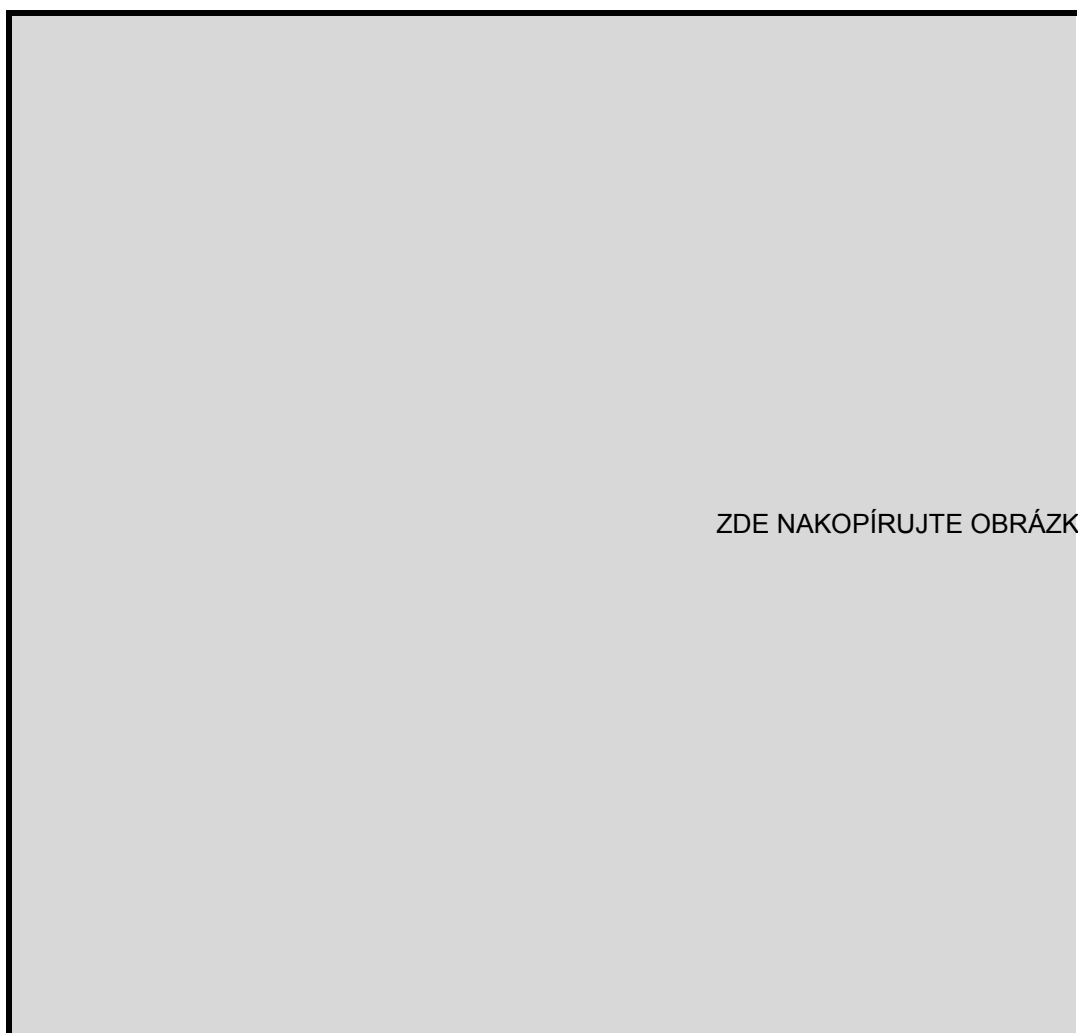


X	= blank (naive/negative control; SDS)
X	= concentration of BSA standard [mg/mL]
X	= name of the sample

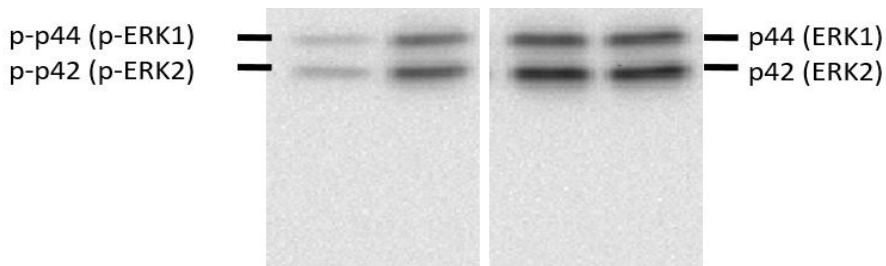
X	= pole/hodnoty k VÝPOČTU !!!
---	------------------------------

VYHODNOCENÍ					
	Denzita				RD [pERK1]
	Fosfo-ERK (pERK)		Celkový ERK (ERK)		
	pERK1	pERK2	ERK1	ERK2	RD [pERK1]
HBE1 - kontrola					#DIV/0!
HBE1 - TPA					

RD = Relativní denzita - srovnání denzity proužků vůči kontrole (kontrola = 1.00)  
 Normalizovaná denzita - srovnání relativní denzity proužku zájmového proteinu v příslušném vzorku s relativní denzitou proužku kontrolního proteinu (MAPK ERK1/2)  
 (v tomto experimentu šlo o zhodnocení podílu fosforylované MAPK ERK1/2 vůči celkovému množství ERK1/2, kde kontrola = 1.00)



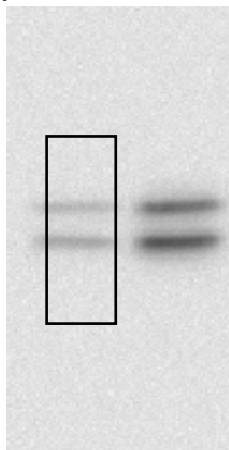
POSTUP VYHODNOCENÍ			
POPIS MEMBRÁN			
Fosfo-ERK1/2		Celk. ERK1/2	
kontrola	TPA	kontrola	TPA



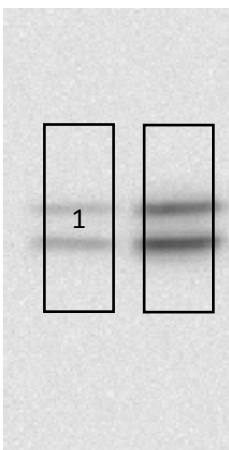
### DENZITOMETRICKÁ ANALÝZA OBRAZU POMOCÍ

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 pE

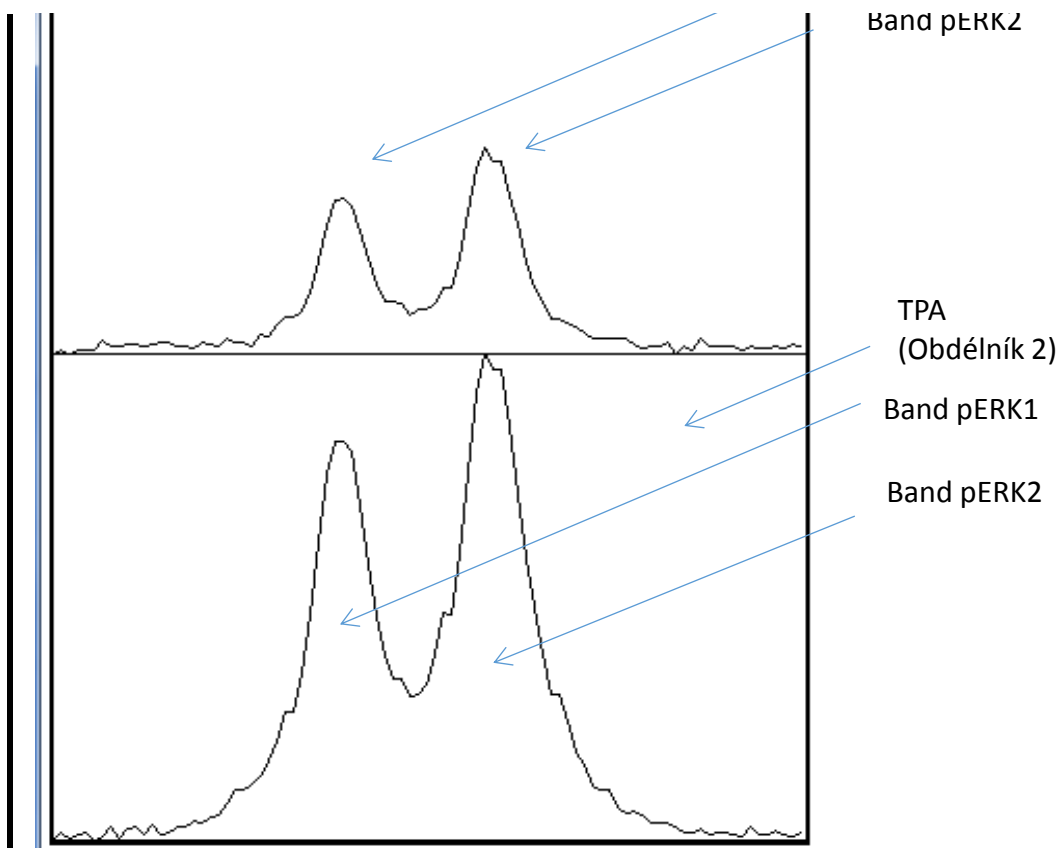


- 3) Stisknout Ctrl+1 (v obdélníku se objeví číslovka 1)
- 4) Přetáhnout pomocí myši vytvořený obdélník č. 1 na místo ohraničující bandy vzorku "TP."

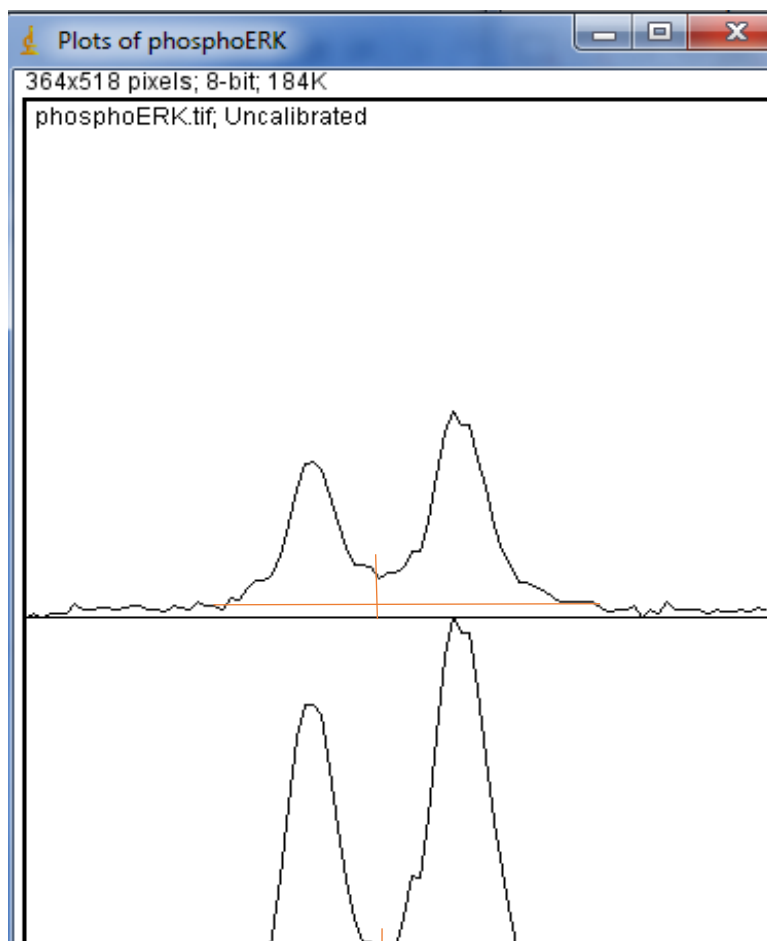


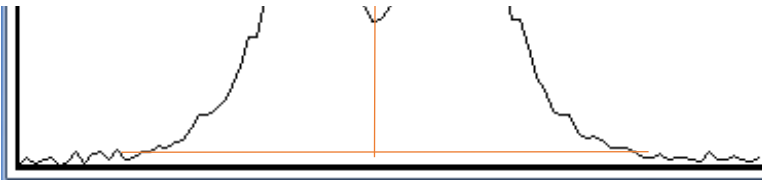
- 5) Stisknout Ctrl+2 (v druhém obdélníku se objeví číslovka 2)
- 6) Stisknout Ctrl+3
- 7) Objeví se denzitometrický profil vzorků - píky odpovídají profilu intenzity signálu jednotliv





- 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 (POZNÁMKA: pořadí hodnot v tabulce odpovídá pořadí, v jakém byly píky vybrány)
- 13) Obrázky s píky s hodnotami vložte prosím sem (použít v ImageJ funkci "Copy To System Clipboard")
- 14) Hodnoty "AREA" nebo "Percent" dosadit do tabulky na začátku tohoto souboru  
=> vypočte se relativní densita bandů
- 15) Celý postup opakovat s obrázkem celkového ERK1/2, tzn. totalERK1/2.tif  
=> proběhne normalizace relativních densit podle density neovlivněného kontrolního pásu

**PODROBNOSTI viz**

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

## ENÍ (postup viz níže)

Relativní 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!

enzitou proužku neovlivněného proteinu (např. protein kontroly nanášení - house-keeping, nebo v našem případě celková eré by nemělo být krátkodobou expozicí TPA prakticky ovlivněno, proto jsou hodnoty pERK normalizovány na celkový ERK)

Y DENZITOMETRICKÉ ANALÝZY S PÍKY

## ENÍ

Western blotting kontrolních HBE1 buněk vs. buněk exponovaných chemikálií s nádorově promočnými účinky, 12-O-Tetradekanoylforbol-13-acetát (TPA, 200 nM, 30 min). Metodou Western blot byla detekována aktivovaná

metoda 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)

## CÍ PROGRAMU IMAGEJ

RK1/2 v kontrolním vzorku

A"

ých bandů

1



1)

vé ploše ("Percent")

ly píky vybrány pomocí "Wand" hůlky)

m" v záložce "Edit", pak Ctrl+V)

ěného proteinu (v tomto případě totalERK)