

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 reagentu A a 1 díl reagentu 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 3x10 uL + 10 uL (rezerva) = 40 uL
 - vzorky je vhodné naředit:
 - při použití misky 9 cm², 150 uL lyzačního pufru a předpokládaném výtěžku extrakce 30-60 ug proteinu/cm²:
 - $(9 \text{ cm}^2 \times 30 \text{ ug/cm}^2) / 150 \text{ uL} = 1.8 \text{ mg/mL}$
 - $(9 \text{ cm}^2 \times 60 \text{ ug/cm}^2) / 150 \text{ uL} = 3.6 \text{ mg/mL}$
 - => očekávaná koncentrace proteinů ve vzorku velmi pravděpodobně překročí koncentrační rozsah metody
 - snížení koncentrace složek lyzačního pufru, které mohou interferovat s metodou stanovení (zkontrolovat tabulku compatibility!)
 - 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 3x10 uL + 10 uL (rezerva) = 40 uL
 - kalibrační standard ve vodě je vhodné naředit lyzačním pufrům tak, aby podíl lyzačního pufru ve vzorcích standardu odpovídal podílu lyzačního pufru v neznámých vzorcích naředěných pro stanovení

Pomůcky:

- 1.5 mL mikrozkušavky, 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 mikrozkušavky napipetovat **30 uL vody** a přidat **10 uL buněčného lyzátu**
- 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 mikrozkušavky napipetovat **30 uL roztoku MilliQ vody** a přidat **10 uL lyzačního pufru**
- Standardy BSA: do mikrozkušavky 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

