# 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 cm2 x 30 ug/cm2) / 150 uL = 1.8 mg/mL*

*(9 cm2 x 60 ug/cm2) / 150 uL = 3.6 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 3x10 uL + 10 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 naředěných 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 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 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 Reagentu A a 1 díl Reagentu B):

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

Příklad: ((1 + 7 + 10) x 3 x 200) + 700 = 11500 uL

11500 uL / 50 = 230 uL

=> Napipetovat **11500 uL Reagentu A** a přidat **230 uL Reagentu B** => **11730 uL Reagentu A:B**

**3) Provedení BCA stanovení**

3.1) Do mikrodestičky napipetovat ve **třech opakováních po 10 uL**:

- blank

- BSA standardy

- neznámé vzorky

3.2) Přidat 200 uL 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**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **c stdu BSA (mg/mL)** | **Ředění** | **Finální c stdu BSA (mg/mL)** | **A1** | **A2** | **A3** | **Průměr A** | **SD** | **Cv%** |  |  |
| 0.0 (Blank) | 0,75 | 0.000 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 0.250 | 0,75 | 0.188 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 0.500 | 0,75 | 0.375 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 0.750 | 0,75 | 0.563 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1.000 | 0,75 | 0.750 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1.500 | 0,75 | 1.125 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2.000 | 0,75 | 1.500 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2.500 | 0,75 | 1.875 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **Kalibrační přímka: A(562nm) = SLOPE \* c (mg/mL) + INTERCEPT** | | | | | | | | | | |
|  |  | **SLOPE (Směrnice):** | | | |  | | | | |
|  |  | **Intercept:** | | | |  | | | | |
| **Vzorek** | **Ředění** | **A1** | **A2** | **A3** | **C1** | **C2** | **C3** | **Průměr C** | **SD** | **Cv%** |
| 1 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 3 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 4 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 6 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 7 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 8 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 9 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 10 | 0,25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |