

# Stanovení koncentrace proteinů

**Spektroskopie** v UV oblasti umožňuje stanovit koncentraci a čistotu biologických molekul.

Molekuly DNA mají absorpční maximum kolem 260 nm, molekuly proteinů kolem 280 nm.

Pro přímé spektrální určení koncentrace se využívá Lambert-Beerova zákona pro monochromatické světlo, který lze zapsat ve tvaru  $A = c \cdot \epsilon$  za předpokladu, že měříme v 1 cm kyvetě a známe extinkční koeficient  $\epsilon$ , který má jednotku  $[M^{-1}cm^{-1}]$  pro molární koncentraci nebo  $[mL \cdot mg^{-1}cm^{-1}]$  pro koncentraci v mg/mL.

Pro určení koncentrace proteinů spektroskopicky lze využít absorbance proteinů při 280 nm. Jestliže známe primární sekvenci aminokyselin proteinu, lze extinkční koeficient vypočítat <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>. Ze změřené absorbance pak určíme koncentraci proteinu.

Znalost extinkčního koeficientu není nutná v případě univerzální Bradfordovy metody. **Bradfordova metoda** je v současnosti nejrozšířenější způsob určování koncentrace proteinu. Bradfordova metoda využívá posunu absorpčního maxima „Coomasie Blue“ po vazbě na protein. Na rozdíl od přímého spektroskopického stanovení se zde používá vlnová délka 595nm. Za použití kalibrační křivky se známou koncentrací proteinu lze určit skutečnou koncentraci neznámého proteinu nebo směsi proteinů.

V obou případech stanovení dbejte na to, aby výsledná hodnota absorbance byla v oblasti lineárního růstu absorbance – tato oblast odpovídá  $A = 0,3 - 0,7$ .

## Materiál

- BSA (hovězí sérový albumin;  $\epsilon = 0.677 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , MW = 66430; přibližná koncentrace 5 mg/mL)
- TE pufr
- Bradford reagent (BioRad)
- Kyvety a spektrofotometr

## Protein

### UV spektroskopie

1. Připravte roztok BSA v TE pufru ze zásobního roztoku tak, aby bylo možno přesně určit koncentraci BSA.
2. Změřte absorpční spektrum BSA v rozsahu vlnových délek 240 až 350 nm:

**Nastavení přístroje Beckman DU<sup>®</sup>730:**

–  –  – nastavit hodnoty min a max  $\lambda$  –  –  –

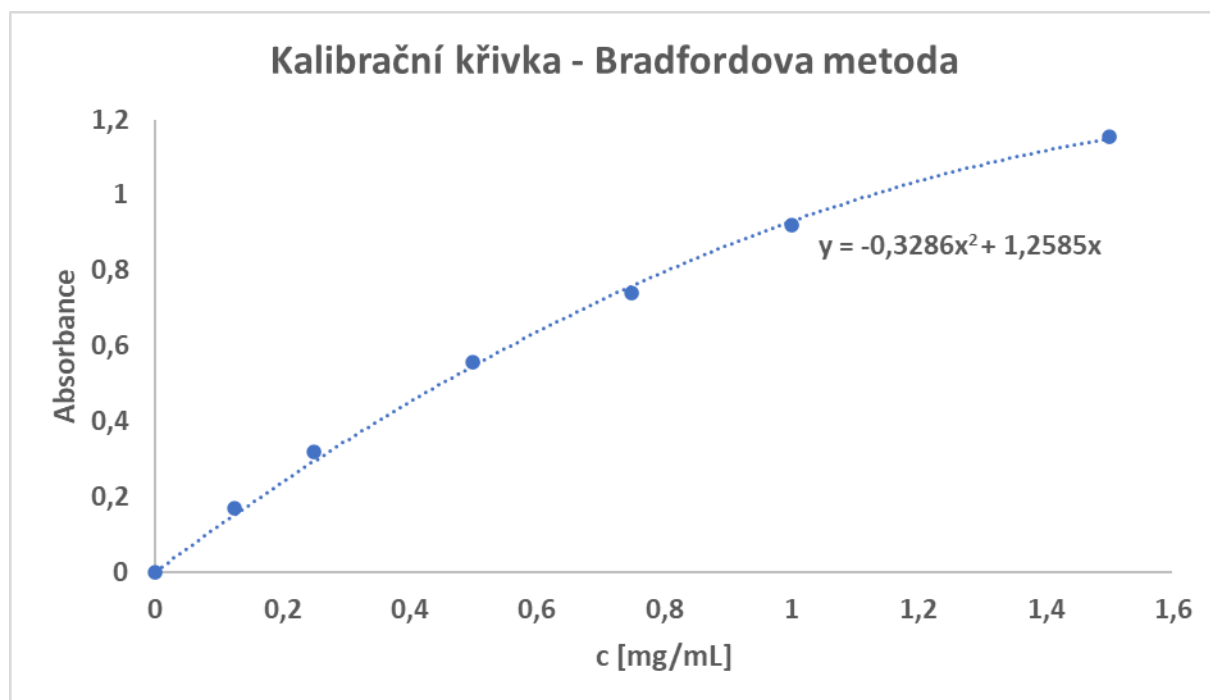
3. Určete polohu absorpčního maxima.
4. Stanovte přesnou molární koncentraci proteinu BSA v zásobním roztoku z hodnoty absorbance naředěného roztoku.

## Bradfordova metoda

1. Odvážení BSA a vyředěním do TE pufru si připravte standardní kalibrační roztoky o koncentracích 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1 mg/mL a 1.5 mg/mL.
2. Vezměte roztok reakčního Bradfordova činidla z lednice a nechte jej zahřát na pokojovou teplotu a promíchejte.
3. Připravte roztoky blanku a standardů BSA o celkovém objemu 1mL do mikrokumavek tak, že do 980  $\mu$ L reakčního Bradfordova činidla přidejte vždy 20  $\mu$ L TE pufru nebo 20  $\mu$ L standardů.
4. Současně připravte stejným způsobem roztoky BSA o neznámé koncentraci pro jejich stanovení.
5. Všechny roztoky dobře promíchejte a nechte inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Inkubace by neměla přesáhnout 1h.
6. **Nastavení spektrofotometru Beckman DU<sup>®</sup>730:** Protein Assay Analysis – Bradford – Start – Standard Curve – Standards Setup - vypište hodnoty koncentrací standardů od nejmenší přes Edit concentration – Done – změřte absorbanci blanku (ten si nechte pro následný krok), poté standardů. Změňte rovnici na Non-linear - Done

Výstupní hodnoty pro tvorbu kalibrační křivky:

c [mg/mL]	0	0,125	0,25	0,5	0,75	1	1,5
A	0	0,171	0,32	0,557	0,739	0,92	1,156



7. Změřte absorbanci blanku, jednoho standardu (pro kontrolu) a poté neznámých vzorků a pomocí kalibrační křivky určete jeho koncentraci.