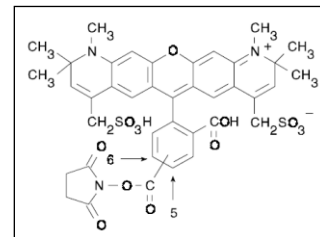


Fluorescenční značení proteinu

Fluorescenční značení proteinu bude provedeno za použití soupravy Alexa Fluor 594 Protein Labeling Kit. Proteiny značené tímto fluoroforem vykazují excitační maximum 594 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 inotů a primárních aminů. V případě, že protein je v jiném pufru (Trisový, glycinový), je možno dialýzou pufr změnit.

Materiál

- Alexa Fluor 594 ($\epsilon_{\text{alexa}} = 92\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- Tmavá zkumavka s magnetickým míchadlem
- Roztok proteinu ve fosfátovém pufru (TRF2, MW = 55 634, extinkční koeficient $\epsilon = 47\,565\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, zásobní koncentrace 2 mg/ml)
- 1M roztok hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO₃, MW = 84), 1 ml
- Fosfátový pufr (50 mM NaCl, 50 mM fosfát sodný, pH 7,0)
- Kolonka s náplní Sephadex G-25
- Kyvety
- Spektrofotometr (Hach Lange DR6000)

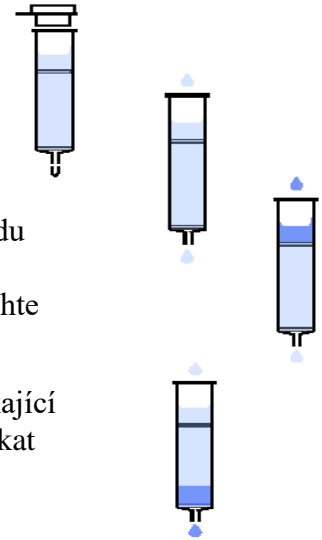
Značení proteinu

1. Do tmavé zkumavky napipetujte 500 ul proteinu o zásobní koncentraci 2 mg/mL.
2. Zkumavku s fluorescenční značkou nechte zahřát na laboratorní teplotu. Přidejte 50 μ l 1M NaHCO₃ do zkumavky s vysušenou značkou a promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Odpipetujte do mikrozkušavky s proteinem a promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
3. Vše nechte míchat v tmavé zkumavce s magnetickým míchadlem po dobu 30 minut při laboratorní teplotě zakryté alobalem.
4. 5-10 minut před koncem inkubace připravte kolonu pro separaci proteinu a nenavázané fluorescenční značky.

Purifikace proteinu

Náplň kolony Sephadex G-25 umožňuje gelovou filtrací oddělit nenavázanou 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 tmavé zkumavky 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 mikrozkuvek po 1 ml. Po cca 2-3 ml začíná vytékat značený protein. Zachyťte značený protein do **jedné** frakce. A poté nenavázanou barvičku do jiné 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:

Skenování vln.délky Možnosti λ - nastavit hodnoty min a max λ (260-600 nm) - OK - vložte kyvetu s blankem - Nulovat - měřte jednotlivé vzorky - Načítat

Případně: Možnosti Štupnice a jednotky manuál - upravit rozsah osy Abs, aby byla maxima spektra dobře viditelná

Určení koncentrace proteinu

$CF_{[M]} = \frac{A_{280 \text{ volné značky}}}{A_{594 \text{ volné značky}}}$; CF je korekční faktor udávající příspěvek značky k absorpčnímu spektru

$$A_{\text{protein}} = A_{280 \text{ protein}} - (A_{594 \text{ protein}} \cdot CF) \quad C_{\text{protein}} [M] = \frac{A_{\text{protein}}}{\epsilon_{\text{protein}}}$$

Výpočet stupně značení proteinu

$$\text{stupeň značení} = \frac{A_{594 \text{ protein}}}{\frac{\epsilon_{\text{Alexa 594}} = 92\,000}{C_{\text{protein}} [M]}} \quad V_{\text{ýtěžek}} [mg] = c_{[M]} \cdot M_w \cdot V_{[ml]}$$

$$\text{obecně stupeň značení} = \frac{\text{molární množství značky}}{\text{molární množství proteinu}} = \frac{\text{koncentrace značky}}{\text{koncentrace proteinu}} = \frac{A_{594 [\text{protein}]}}{\frac{\epsilon_{594 [\text{alex}]}}{C_{\text{protein}} [M]}}$$

kde $\epsilon = 92\,000$ je molární extinkční koeficient značky Alexa Fluor 594 při 594 nm, C koncentrace proteinu v M a MW je molekulová hmotnost proteinu.

Výsledky

Zajímá nás: výtěžek (získané množství proteinu po značení) a stupeň značení.