

1 Stanovení proteinů

1.1 Teoretický úvod

Stanovení celkové koncentrace proteinů v roztoku je jednou z nejčastěji prováděných analýz v biochemických laboratořích. Přes zdánlivou jednoduchost se však provedení používaných metod stanovení proteinů potýká s řadou problémů, které často vedou k nesprávným nebo nepřesným výsledkům. Cílem této úlohy je studenty podrobněji seznámit s nejběžnějšími metodami stanovení proteinů a jejich přednostmi a slabinami.

Dnes se v praxi výzkumných i rutinních laboratořích používají prakticky pouze spektrofotometrické metody, pro úplnost je však nutné zmínit i historické metody Kjeldahlovu a Dumasovu. Jejich použití je omezeno velkou pracností a časovou náročností, ovšem dodnes slouží jako základní referenční metody pro přesnou analýzu proteinů, např. u obilných zrněk v potravinářství. Obě metody v podstatě stanovují celkové množství dusíkatých látek ve vzorku, Kjeldahlova metoda po mineralizaci dusíkatých látek na amoniak a Dumasova metoda po jejich redukci na plynný dusík. Pro tento typ historických metod byla nutná složitá a zdoluhavá příprava vzorků. V dnešní době je cílem vzorek minimálně upravovat, aby jeho analýza byla co nejrychlejší a nejlevnější. Na to se klade důraz například v klinické biochemii, při analýze krevních proteinů je nutné znát výsledek do několika minut, protože na výsledku může záviset medikace pacienta.

Při výběru metod musíme zvážit zejména následující kritéria:

- množství a charakter analyzovaných proteinů,
- možnosti pro vlastní analýzu, tj. přístrojové vybavení,
- přítomnost interferujících látek,
- požadavek na citlivost a přesnost analýzy.

Používané spektrofotometrické metody můžeme rozdělit na:

- **přímé metody** – založené na spektrálních vlastnostech proteinů,
- **nepřímé metody** – založené na interakci mezi proteiny a činidlem, při kterých dochází ke změně spektrálních vlastností činidla.

1.2 Přímé metody

- měření absorbance v blízké UV oblasti (vlnová délka 280 nm)
- měření absorbance v daleké UV oblasti (vlnová délka 205 nm)

1.2.1 Měření absorbance v blízké UV oblasti

Stanovení proteinů v blízké UV oblasti je umožněno přítomností chromoforů v molekulách proteinů, zejména tyrosinu a tryptofanu s absorpčním maximem 275–280 nm. Metoda je relativně málo citlivá a vykazuje velkou závislost na aminokyselinovém složení proteinu. Proto se pro stanovení koncentrací proteinů nepoužívá.

Prakticky se ale metoda používá pro stanovení čistoty nukleových kyselin, kdy interference proteinů (daná přítomností tyrosinu a tryptofanu) se eliminuje měřením při dvou vlnových délkách a početní korekcí.

1.2.2 Měření absorbance v daleké UV oblasti

Měření v daleké UV oblasti při 205 nm je založeno na absorpci peptidové vazby s $\lambda_{\max} = 192$ nm. Při měření při této vlnové délce je nutno precizně volit složení pufru. Vzorky by měly být zbaveny opaleskujících malých částic centrifugací a ve vzorku by měl být snížen na minimum obsah O_2 . Pro výpočet koncentrace je možno použít empirický vzorec:

$$c \text{ (mg/ml)} = A_{205} [27 + 120 (A_{280}/A_{205})]$$

Hlavní výhodou přímého měření proteinů v UV oblasti je nedestruktivní analýza vzorku, tj. po jejím provedení je možno vzorek dále použít. Hlavní nevýhodou je nutnost použití křemenných kyvet, příp. u mikrodestičkového readeru speciálních mikrodestiček z plastu propouštějícího UV záření.

1.3 Nepřímé metody

1.3.1 Redukční reakce

- **Biuretová metoda**

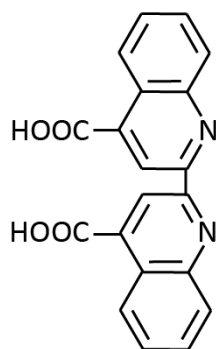
Biuretová metoda je založena na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidu ionizovanými v silně alkalickém prostředí za vzniku červeno-fialového komplexu. Je pojmenována podle sloučeniny biuretu, vznikajícího tavením močoviny za odštěpení amoniaku, která je modelem dvou peptidových vazeb a vytváří za těchto podmínek barevný komplex s mědí. Se stanovením interferuje glukosa a jiné měď redukující látky jako např. proteiny bohaté na sulfhydrylové skupiny (keratin). Taktéž interferují vysoké koncentrace amonných solí a některé fosfáty užívané při purifikaci proteinů. Biuretová metoda je vhodná pro vzorky obsahující protein v koncentraci 1–10 mg/ml, které se ředí zhruba 5× přidáním činidla na konečnou koncentraci proteinu 0,2–2 mg/ml. Většina proteinů poskytuje tmavě červené zbarvení s maximem absorbance při 550 nm.

- **Lowryho metoda** (Hartree-Lowryho metoda)

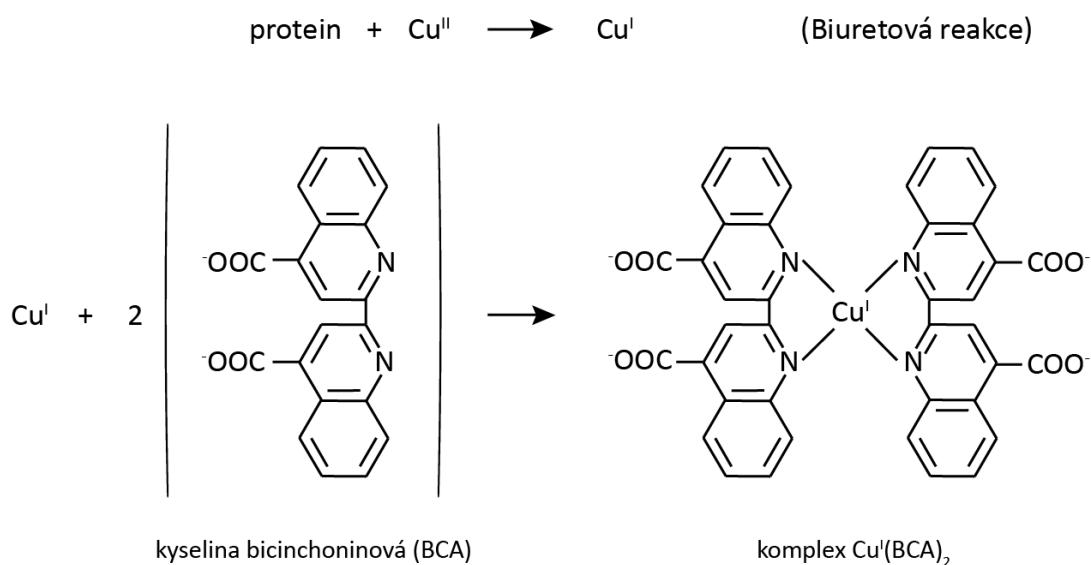
Lowryho metoda stanovení proteinů publikovaná v roce 1951 je s oblibou uváděná jako jedna z nejcitovanější biochemických prací. V původním provedení je založena na metodě biuretové, tj. chelataci Cu^{2+} iontů imidovými skupinami polypeptidů v silně alkalickém prostředí. Hartreeho modifikace Lowryho metody přinesla výrazné zjednodušení, zvýšení citlivosti a rozšíření lineárního rozsahu reakce. Modifikovaná Lowryho metoda zahrnuje použití dvou činidel pro biuretovou reakci v kombinaci s Folin-Ciocalteuovým činidlem pro fenoly, obsahujícím fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny redukované tyrosinovými zbytky proteinů za vzniku modrého barviva ($\lambda_{\max} = 740$ nm).

- **Metoda s kyselinou bicinchoninovou** (BCA, „bicinchoninic acid assay“)

Tato metoda je podobně jako Lowryho metoda založena na tvorbě komplexu Cu^{2+} iontů s proteiny a jejich následné redukce na ionty Cu^+ . Na redukci se podílí peptidová vazba a dále cystein, cystin, tryptofan a tyrosin. Kyselina bicinchoninová (Obr. 5.1) tvoří s Cu^+ ionty v alkalickém prostředí modro-fialový komplex ($\lambda_{\max} = 562$ nm) (Obr. 5.2).



Obr. 1: Kyselina bicinchoninová.



Obr. 2: Reakce probíhající při stanovení proteinů bicinchoninovou metodou.

Pro reakci mezi roztokem BCA a peptidovými vazbami v proteinech je ideální teplota 37 °C. Při pokojové teplotě reaguje roztok BCA pouze s tyrosinovými, threoninovými a cysteinovými aminokyselinovými zbytky v proteinech. Metoda BCA má ve srovnání s Lowryho metodou jednodušší provedení a vyšší citlivost, ve srovnání s metodou Bradfordové je méně variabilní pro rozdílné proteiny a méně náchylná na interferenci detergentů. Pokud je ve vzorku přítomná kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA) nebo jiné chelatační činidlo, je vhodné vzorek vhodně naředit a 2–3x zvýšit množství Cu²⁺ iontů v pracovním BCA činidle. Citlivost metody je závislá na době a teplotě inkubace, na charakteru proteinu použitého ke standardizaci apod. Některé skupiny látek jako jsou např. redukující sacharidy a amonné ionty interferují velmi silně, lze je odstranit např. dialýzou.

1.3.1.1 Reakce aminokyselin s vhodným činidlem

- *Ninhydrinová metoda po kyselé hydrolyze proteinů*

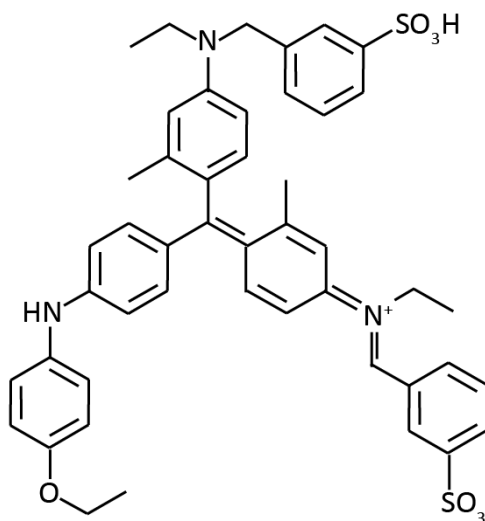
Při tomto stanovení jsou proteiny hydrolyzovány na aminokyseliny 6% kyselinou sírovou při teplotě 100 °C. Hydrolyzáty jsou neutralizovány a aminokyseliny kvantifikovány derivatizací ninhydrinem a měřením absorbance při 570 nm. Při stanovení neinterferují fenoly a podobné sloučeniny jako při stanovení Folinovým činidlem. Jednotlivé aminokyseliny při reakci s ninhydrinem neposkytují stejný "barevný výtěžek". Většina proteinů, kromě těch, které

mají neobvyklé složení, jako je např. vysoký obsah hydroxyprolinu a prolinu (kolageny), vysoký obsah síry (cystein; např. alkoholdehydrogenasa, thionein), nebo hustě glykosylované proteiny (např. invertasa a glykoforin) poskytují uspokojivé výsledky při použití leucinu jako kalibračního standardu. Amonné ionty se ninhydrinem silně barví, přibližně stejně jako leucin. Pokud se před hydrolýzou proteiny vysráží kyselinou trichloroctovou, amonné ionty zůstanou v supernatantu. Metoda je časově náročná. Osvědčuje se při stanovení proteinů v pevném a suchém materiálu, který lze získat z rostlin. Výhodou je také to, že při stanovení neinterferují báze nukleových kyselin.

1.3.1.2 Tvorba komplexů s barvivy

- **Metoda dle Bradforda**

Tato metoda je založena na tvorbě komplexu mezi proteiny a triarylmetanovým barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 (Obr. 5.3) v kyselém prostředí. Po vazbě na protein se absorpční maximum G-250 posunuje ze 465 na 595 nm. Na rozdíl od Lowryho a BCA metody je tato metoda kompatibilní s redukcujícími látkami používanými pro stabilizaci proteinů v roztoku, ovšem není ji možné použít v přítomnosti detergentů narušujících tvorbu komplexu s proteiny. Podobně jako u mnoha jiných barviv, nese použité barvivo „Coomassie“ jméno po místním africkém názvu, v tomto případě ghanském městě Kumasi. Barva byla vyvinuta jako barvicí prostředek pro vlnu a pojmenována jako připomínka britské okupace hlavního města ghanského království Ashanti v r. 1896, nesoucího tenkrát domorodé jméno Coomassie.



Obr. 3: Triarylmetanové barvivo – Coomassie Brilliant Blue G-250.

- **Metoda využívající NanoOrange**

Jednou z moderních citlivých metod stanovení velmi malých množství proteinů je postup založený na látce NanoOrange (ochranná známka firmy Molecular Probes). Tato látka se váže na molekuly proteinů přes navázané molekuly detergentu dodecylsírany sodného (SDS). Metoda je teoreticky nespecifická, nezávisí na typu aminokyselin v proteinu. Nevýhodou metody je nutnost inkubace vzorku při teplotě 95 °C, což je postup ne vždy dobře kompatibilní s polystyrenovými mikrodestičkami při realizaci stanovení v mikrodestičkovém uspořádání. Tato látka je zatím komerčně dostupná pouze jako součást relativně drahého firemního kitu.

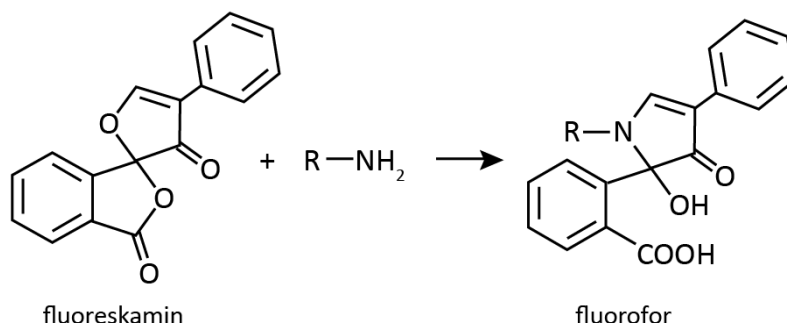
1.3.1.3 Fluorescenční deriváty

- metody s fluoreskaminem
- metody s *o*-ftaldialdehydem

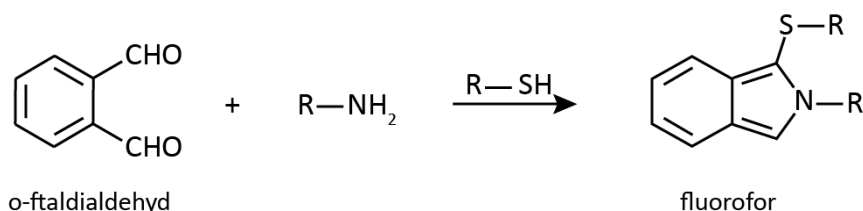
U této skupiny metod je stanovení proteinů založeno na reakci činidla se specifickými aminokyselinami za vzniku fluorescenčního produktu. Fluorimetrické metody jsou obecně citlivější než spektrofotometrické metody, ale také náchylnější na nejrůznější interference v matrici vzorku. Navíc je měření každého vzorku omezeno nestálostí fluorescenčního signálu v čase, intenzivní ozáření vzorku během měření ve fluorimetru snižuje intenzitu fluorescence pro další opakované měření.

Jedna z popsaných metod využívá reakci nefluoreskujících látek jako je fluoreskamin (4-phenyl-spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion) (Obr. 5.4) nebo *o*-ftaldialdehyd (OPA) (Obr. 5.5) s primárními aminoskupinami v proteinu za tvorby vysoce fluoreskujících produktů.

Díky vysoké citlivosti umožňují stanovení proteinů s použitím velmi malých vzorků v řádu ng proteinu na ml. Z povahy reakce je ovšem zřejmé, že interferovat budou všechny ostatní látky obsahující volnou aminoskupinu, jako např. Tris nebo glycinový pufr. Navíc může být reakce primární skupiny lysinu ovlivněna jeho dostupností, lišící se v nativním a denaturovaném proteinu. Použití fluoreskaminu je navíc omezeno jeho malou rozpustností ve vodném prostředí, které znamená nutnost použití vyšší koncentrace organického rozpouštědla, např. acetonitrilu. Použití *o*-ftalaldehydu představuje řadu výhod díky větší stabilitě vodných roztoků činidla a řádově vyššímu kvantovému výtěžku produktu. Pro reakci OPA s proteinem je nejvhodnější alkalický borátový pufr a je nutná přítomnost thiolové skupiny.



Obr. 4: Fluoreskamin.



Obr. 5: *o*-ftaldialdehyd.

1.4 Porovnání metod stanovení proteinů

1.4.1 Časová náročnost metod stanovení celkových proteinů

- K realizaci biuretové, Hartree-Lowryho a BCA metody je třeba 40 -60 min.
- Metoda ninhydrinová spojená s kyselou hydrolyzou vyžaduje první den jednu hodinu, poté hydrolyzu přes noc a druhý den jednu až dvě hodiny na vlastní měření.
- Metoda měření v UV oblasti spotřebuje jen 5–10 minut.
- Metoda Bradfordové 20 až 30 minut.

1.4.2 Citlivost a výhody případně nevýhody jednotlivých metod

V tabulce 1 jsou u daných metod uvedeny příklady interferujících látek. V tabulce 2 jsou přehledně porovnány citlivosti jednotlivých metod, výhody a nevýhody daného uspořádání.

Tab. 1: Přehled interferujících látek.

Metoda	Interferující látky
Biuretová	Síran amonný, glukosa, sulfhydrylové sloučeniny, fosforečnan sodný, některé aminokyseliny
Hartree-Lowry	EDTA, guanidin.HCl, Triton X-100, SDS, > 0,1 M Tris, síran amonný, 1 M octan sodný, 1 M fosforečnan sodný, glycin, merkaptany
BCA	EDTA, > 10 mM sacharosa nebo glukosa, 1 M glycin, > 5% síran amonný, 2 M octan sodný, 1 M fosforečnan sodný, DTT
Ninhydrinová	Síran amonný, aminosacharidy
UV	Barviva, fenolové látky, organické kofaktory, > 0,5 % Triton X-100, puriny, pyrimidiny, nukleové kyseliny
Bradford	> 0,5% Triton X-100, > 0,1% SDS, deoxycholan sodný, silně bazické pufrů

Vysvětlivky: EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina, Triton X-100 – polyoxyetylenový detergent s alkylfenylovými skupinami, SDS – sodiumdodecylsulfát (dodecylsíran sodný).

Tab. 2: Porovnání citlivosti, výhod a nevýhod metod stanovení proteinů.

Metoda	Citlivost	Výhody a nevýhody metody
NanoOrange	10 ng/ml – 10 µg/ml velká	Vzorky je možno vyhodnotit do 6 hod bez ztráty signálu. Nízká variabilita signálu mezi různými proteiny. Neovlivněno redukčními činidly a nukleovými kyselinami. Vyžaduje zahřívání vzorků na 95 °C. Nekompatibilní s detergenty.
OPA	50 ng/ml – 2 mg/ml velká	Nekompatibilní s látkami obsahujícími aminoskupinu.
BCA	0,5 µg/ml – 1,5 mg/ml velká	Vzorky musí být změřeny v úzkém časovém intervalu. Nekompatibilní s redukčními činidly.
Bradford	1 µg/ml – 1,5 mg/ml velká	Postupné srážení proteinů v reakční směsi. Vysoká variabilita signálu mezi různými proteiny. Nekompatibilní s detergenty.
Hartree-Lowry	1 µg/ml – 1,5 mg/ml velká	Časově náročný vícekrokový postup. Nekompatibilní s detergenty i s redukčními látkami.
UV	50 µg/ml – 2 mg/ml střední	Vysoká variabilita signálu mezi různými proteiny. Ovlivněno přítomností nukleových kyselin a dalších kontaminant absorbujících v UV oblasti.
Biuretová	1–20 mg/ml nízká	Velmi zdoluhavá a málo citlivá metoda. Výhodou je nezávislost na aminokyselinovém složení.

Nepřímé metody pro stanovení proteinů využívají tzv. kalibračních funkcí pro určení koncentrace proteinů v neznámých vzorcích. Nejčastěji se využívá lineární funkce, méně často pak funkce polynomické a další. Pro přípravu kalibrace, resp. zjištění kalibrační funkce, se využívá standardních roztoků proteinů. Ve většině případů se využívají tyto proteiny: hovězí sérový albumin (BSA, z angličtiny: bovine serum albumine) a imunoglobulin G (IgG).

2 Praktická část: stanovení proteinů Bradfordovou metodou ve zkumavkovém a mikrodestičkovém uspořádání

2.1 Cíle úlohy:

- 1) Zvládnutí ředění roztoků standardů a vzorků pro měření.
- 2) Tréning přesného pipetování.
- 3) Sestavení kalibrační funkce a grafu.
- 4) Porovnání metod stanovení proteinů ve vzorcích ve zkumavkovém a mikrodestičkovém uspořádání.
- 5) Zjištění koncentrací celkových proteinů v měřených vzorcích.

2.1.1 Materiál

Proteiny lze stanovovat v různých vzorcích, zpracování vzorků a extrakce se provádí různými způsoby. V tomto cvičení budou proteiny stanovovány v sušeném mléce nebo v proteinovém nápoji pro sportovce.

2.1.2 Přístroje

Digitální předvážky, analytické váhy, vortex, centrifuga, spektrofotometr, mikrodestičkový reader.

2.1.3 Chemikálie

Albumin, ethanol, kyselina fosforečná, Coomassie Brilliant Blue G-250, destilovaná voda, dodecylsírán sodný (SDS)

2.1.4 Roztoky

čínidlo Bradfordovo (zásobní roztok): zásobní roztok Coomassie Blue (50 mg Coomassie Blue G-250 se rozpustí ve 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné, doplní se deionizovanou H₂O na 100 ml, uchovává se při 4 °C ve tmě).

2.1.5 Standardy pro přípravu kalibračních roztoků

- 1) Připravíme si 100 ml zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (zkrácovaného jako BSA) o koncentraci 100 µg/ml. Navážku albuminu je potřeba spočítat a výsledek konzultovat s vedoucím cvičení. Zásobní roztok BSA naředíme přesně do 100 ml odměrné baňky!
- 2) Po jeho správném naředění část roztoku přelijeme z odměrné baňky do kádinky, z níž budeme roztok odebírat při další práci.
- 3) Standardy: připravíme si mikrozkušavky, které si očíslováme, viz tabulka níže. Do těchto zkumavek budeme pipetovat rozpuštěný standard BSA v příslušných koncentracích. V každé mikrozkušavce se standardem je finální objem 1 ml. Standardy promícháme na vortexu.
- 4) Připravíme si blank: blankem neboli slepým vzorkem se rozumí takový vzorek, který obsahuje veškerá činidla kromě vzorku nebo standardu. Místo nich se používá voda, resp. rozpouštědlo použité pro rozpuštění standardů. Dále byl zpracováván jako vzorky nebo kalibrační standardy!

- 5) Naředíme si zásobní roztok Bradfordova činidla na pracovní koncentraci. Zásobní roztok činidla ředíme 5x; celkově budeme potřebovat 50 ml pracovního roztoku Bradfordova činidla.

Tab. 3: Koncentrace standardů BSA pro kalibrační řadu v rozmezí koncentrací 0 – 100 µg/ml a postup přípravy daných koncentrací ze zásobního roztoku BSA o koncentraci 100 µg/ml.

Číslo zkumavky	Koncentrace BSA (µg/ml)	Příprava standardů (doplní student)		Celkový objem (µl)
		Objem vody (µl)	Objem zásobního roztoku BSA (µl)	
1	10			1000
2	20			1000
3	30			1000
4	40			1000
5	50			1000
6	60			1000
7	70			1000
8	80			1000
9	90			1000
10	100			1000

2.1.6 Příprava vzorků, v nichž bude stanovována koncentrace proteinů

Stanovení celkových proteinů v sušeném mléku

- 1) Navažte 10 mg sušeného mléka a rozpust'te jej v přibližně 5 ml vody v kádince a po rozpuštění doplňte do celkového objemu 10 ml v odměrné baňce.
- 2) Vzorek v odměrné baňce zahřívajte **na vodní lázni při teplotě 50 °C** a promíchávejte otáčením baňky s uzávěrem až do úplného rozpuštění mléka.
- 3) Zásobní roztok mléka 10× zřed'te do mikrozkuavky, potřebný objem zředěného roztoku je 2 ml. Takto připravíte **vzorek 1 (M)**.
- 4) Zásobní roztok mléka zřed'te 10× pomocí vody a 10% roztoku SDS tak, aby ve výsledném objemu 2 ml bylo SDS o koncentraci 0,5%. Takto připravíte **vzorek 2 (M-SDS)**.

Tab. 4: Příprava 10x zředěných vzorků pro měření koncentrace proteinů v sušeném mléce.

	Vzorek 1 (M)	Vzorek 2 (M-SDS)
Zásobní roztok sušeného mléka (µl)		
Voda (µl)		
10% SDS (µl)	n/a	

Stanovení celkových proteinů ve výživě pro sportovce

- 1) Navažte 10 mg výživy pro sportovce a rozpust'te jej v přibližně 5 ml vody v kádince a po rozpuštění doplňte do celkového objemu 10 ml v odměrné baňce.
- 2) Zásobní roztok výživy pro sportovce 10× zřed'te do mikrozkuavky, potřebný objem zředěného roztoku je 2 ml. Takto připravíte **vzorek 3 (PN)**.

Tab. 5: Příprava 10x zředěného vzorku pro měření koncentrace proteinů ve výživě pro sportovce.

	Vzorek 3 (PN)
Zásobní roztok výživy pro sportovce (μl)	
Voda (μl)	

Stanovení celkových proteinů v neznámém vzorku (NV)

- 1) Od vyučujícího si vyžádáme neznámý vzorek (vzorek BSA o neznámé koncentraci) pro stanovení koncentrace proteinů.
- 2) Vzorek necháme rozmrznout volně na stole.
- 3) Před měřením vzorek promícháme, dále jej neředíme.
- 4) Po rozmrznutí a promíchání je vzorek připraven ke stanovení koncentrace proteinů.

Připravené vzorky budou následně použity pro stanovení koncentrace celkových proteinů ve zkumavkovém a mikrodestičkovém uspořádání.

2.1.7 Stanovení proteinů ve zkumavkovém uspořádání na stolním spektrofotometru

- 1) Připravíme si sadu skleněných zkumavek pro kalibraci (počet dle počtu kalibračních roztoků), které očíslováme stejně jako kalibrační roztoky, tj. 0 (blank), 1, 2, 3...
- 2) Připravíme si sadu skleněných zkumavek pro vzorky (počet dle počtu vzorků x 2 opakování), které vhodně pojmenujeme.
- 3) **Příprava blanku:** do zkumavky pipetujeme 500 μl vody (objem je totožný jako pro vzorek nebo standard) + 500 μl vody.
- 4) **Příprava standardů:** do očíslovaných zkumavek pipetujeme 500 μl standardu naředěného na příslušnou koncentraci + 500 μl vody. Kalibrační sadu ve zkumavkovém uspořádání připravíme v jednom technickém opakování.
- 5) **Příprava vzorků:** do očíslovaných zkumavek pipetujeme 500 μl připraveného vzorku (mléka, mléka s SDS, proteinové výživy nebo neznámého vzorku) + 500 μl vody. Pro každý vzorek připravíme dvě technická opakování (duplikáty).
- 6) Do všech připravených zkumavek pipetujeme 2000 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla.
- 7) Po napipetování všech komponent reakce do příslušných zkumavek, zkumavky promícháme na vortexu a necháme je 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Měříme do 1 hodiny od ukončení inkubace.

2.1.7.1 Měření na stolním spektrofotometru

- 1) Přístroj zapneme hlavním tlačítkem.
- 2) V nabídce hlavního menu zvolíme Single wavelenght.
- 3) Nastavíme vlnovou délku 595 nm.
- 4) Nejprve musíme přístroj vynulovat (vyblankovat), k tomu použijeme námi připravený blank (slepý vzorek), který ze zkumavky opatrně přelijeme do měřicí kyvety tak, aby kyveta byla ze $\frac{3}{4}$ zaplněná. Stiskneme modré tlačítko na spektrofotometru, přístroj se vynuluje.

- 5) Začneme měřit absorbance kalibračních standardů a vzorků. Standard či vzorek inkubovaný s Bradfordovým činidlem přelijeme do měřicí kyvety. Měření spouštíme zeleným tlačítkem.
- 6) Do přístroje vkládáme vždy očištěné a suché kyvety.
- 7) Ze spektrofotometru si zapisujeme změřené hodnoty absorbancí, výsledky konzultujeme s vedoucím cvičení.
- 8) **DŮLEŽITÉ:** Plastové měřicí kyvety je nutno po každém měření proplachovat roztokem 50% etanolu. Barva Coomassie Brilliant Blue se váže na stěny kyvety, takže při nevymytí kyvety by docházelo k velkému zkreslení měření. **Při měření postupujeme od nejnižší koncentrace k nejvyšší.**

2.1.8 Stanovení proteinů v mikrodestičkovém uspořádání na spektrofotometrickém readru

Připravíme si mikrodestičku, nejprve si rozvrhneme a zapíšeme pozice, do kterých budeme pipetovat blank, kalibrační roztoky a vzorky. **Příčemž blank, kalibrační standardy i vzorky budou na destičce vždy v technických triplikátech**, tzn. ve 3 opakováních (Tab.4).

Tab. 4: Ukázka pozic mikrodestičky, do kterých budou pipetovány roztoky blanku, kalibračních standardů i vzorků.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	std1	std2	...								blank	
B	std1	std2									blank	
C	std1	std2									blank	
D	vzorek1	vzorek2	...									
E	vzorek1	vzorek2										
F	vzorek1	vzorek2										
G												
H												

Na mikrodestičku nesaháme zespodu, přenášíme a zdviháme ji pouze za boční okraje!

- 1) **Příprava blanku:** do příslušných jamek pipetujeme 20 μ l vody (objem je totožný jako pro vzorek nebo standard)
- 2) **Příprava standardů:** do příslušných jamek pipetujeme 20 μ l standardu naředěného na příslušnou koncentraci
- 3) **Příprava vzorků:** do příslušných jamek pipetujeme 20 μ l připraveného vzorku
- 4) Ke všem jamkám následně přidáme 80 μ l vody a 200 μ l pracovního roztoku Bradfordova činidla. Bradfordovo činidlo pipetujeme buď standardním, nebo reverzním pipetováním.
- 5) **DŮLEŽITÉ:** Pořadí pipetování jednotlivých reakčních komponent je nutné dodržet, zajišťuje to správné promíchání vzorků v jamkách.
- 6) Po napipetování všech komponent reakce do příslušných jamek, destičku necháme 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Měříme do 1 hodiny od ukončení inkubace.

2.1.8.1 Měření na spektrofotometrickém readru

- 1) Spustíme počítač, po plném spuštění Windows zapneme i readr.
- 2) Reader se ovládá programem i-Control 1.12

- 3) Po spuštění programu, zvolíme možnost přednastaveného protokolu pro Bradford assay
- 4) Další nastavení readru a měření destičky provádějte ve spolupráci s vedoucím cvičení
- 5) Po skončení měření vypláchneme jamky destičky 50% etanolem a všechny zbytky kapaliny vyklepeme z destičky do ubrousku.

2.2 Vyhodnocení

Kalibrační funkce a výpočet koncentrace

Kalibrační funkce je vynesení závislosti absorbance (osa y) na koncentraci (osa x). Kalibrační funkci jsme získali z proměření absorbancí kalibračních roztoků a jejich vynesení proti dané koncentraci standardu. V tomto případě je kalibrační funkce popsána obecnou rovnicí lineární funkce $y = ax+b$, přičemž:

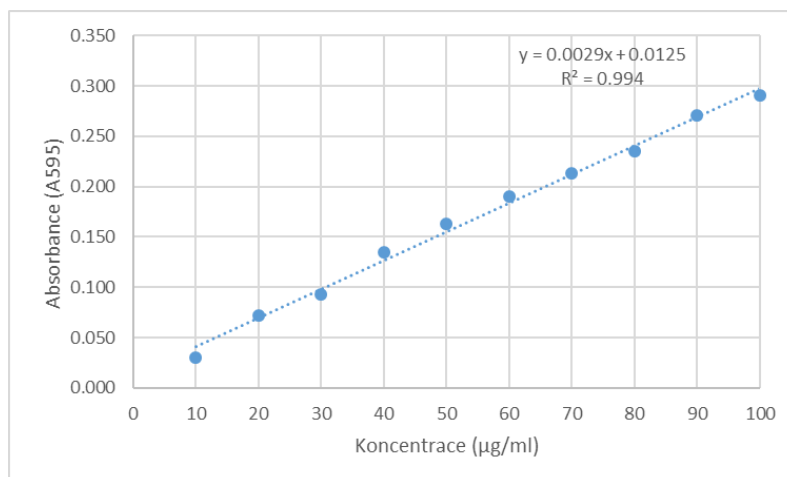
y... hodnota měřeného signálu

a... sklon přímky neboli směrnice

x... koncentrace (uvedená na ose x)

b... úsek neboli průsečík funkce s osou y

Díky rovnici lze z naměřených hodnot absorbancí zpětně dopočítat koncentrace vzorků.



Graf: Příklad kalibrační závislosti zjištěné po proměření roztoků kalibračních standardů BSA o známých koncentracích.

2.2.1 Součásti protokolu

- Kalibrační graf a zápis kalibrační funkce pro zkumavkové i mikrodestičkové uspořádání.
- Výpočty koncentrací měřených vzorků.
- Doplněná tabulka s uvedením měřených absorbancí a vypočítaných koncentrací vzorků (viz níže).
- Porovnání výsledků získaných z měření ve zkumavkovém a mikrodestičkovém uspořádání.
- Porovnání zjištěného obsahu proteinů v mléce a výživě pro sportovce s hodnotou, kterou udává výrobce na obalu výrobku.

- Správného určení koncentrace proteinů v neznámém vzorku, který jste získali od vyučujícího. Tolerovaná odchylka od správné hodnoty je 20 %.

Vzorové tabulky pro protokolů:

Tabulka pro porovnání absorbancí standardů měřených ve zkumavkovém a mikrodestičkovém uspořádání.

Koncentrace standardu (μg/ml)	Absorbance 595 nm	
	Zkumavky	Mikrodestička
10		
20		
30		
40		
50		
60		
70		
80		
90		
100		

Tabulka s vypočítanými koncentracemi a obsahu celkových proteinů. Výsledky a případné odlišnosti je nutné komentovat v protokolu.

Vzorek	Koncentrace roztoku (μg/ml)		Obsah proteinů v sušině 100 g výrobku (g)	
	Zkumavky	Mikrodestička	Zkumavky	Mikrodestička
Sušené mléno ve vodě (M)				
Sušené mléno ve vodě a 0.5% SDS (M-SDS)				
Proteinový nápoj ve vodě (PN)				
Neznámý vzorek od vyučujícího (NV)			n/a	n/a