

Určení koncentrace proteinu fluorescenční metodou a metodou Bradfordové v mikrotitračních destičkách

Teorie

Stanovení celkových proteinů

Celkové množství proteinů lze stanovit pomocí několika metod, například: Hartree-Lowryho metoda, biuretová metoda, bicinchoninová metoda, metoda Bradfordové a fluorescenční metody. Poslední zmíněná metoda je založená na reakci alifatických aminů s barvivem fluorescaminem za tvorby fluorescenčního produktu. Měření může být ovlivněno interferujícími látkami (aminy, peptidy).

Měření fluorescence

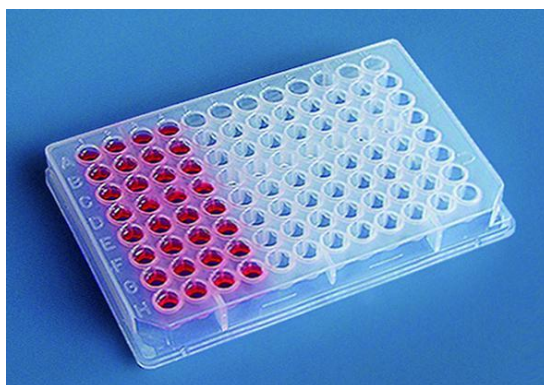
Pokud prochází monochromatické světlo látkou, pak je jeho původní intenzita I_0 zeslabena na hodnotu I . Veličina, která je úměrná tomuto zeslabení, je nazývána absorbance A . Absorbance je definována jako

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde ε je molární extinkční koeficient, c je koncentrace vzorku a l je délka optické dráhy.

V případě, kdy excitujeme kontinuálním světlem o intenzitě I_0 , měříme intenzitu emitovaného záření I . Intenzita emise odpovídá počtu emitovaných fotonů, ale prakticky nedetekujeme všechny tyto fotony, a proto se intenzita fluorescence udává v relativních jednotkách. Měření intenzity fluorescence je přímo úměrné množství fluoroforu, proto je využíváno ke stanovení vazebných konstant dvou molekul nebo ke sledování kinetik chemických reakcí.

Měření na mikrotitračních destičkách

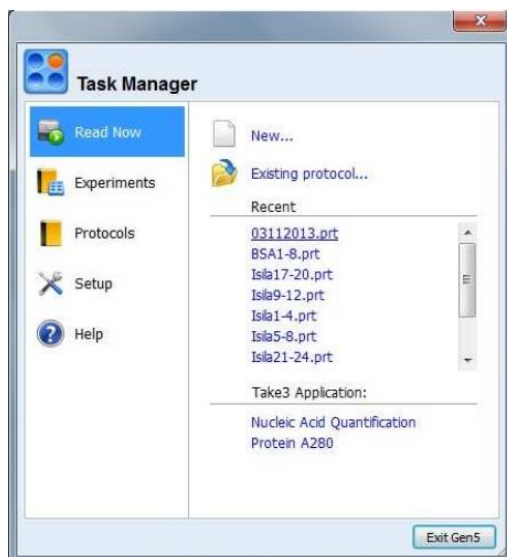


Obrázek 1: Mikrotitrační destička s 96 jamkami.

Měření na mikrotitračních destičkách přináší mnoho výhod jako například minimální množství vzorku, současné měření koncentračních řad nebo měření několikanásobného opakování experimentu s malým časovým nákladem. Dostupné mikrotitrační destičky jsou vyrobeny zejména z plastů, přičemž pro aplikace v UV oblasti jsou vyžadovány specifické vlastnosti. Destičky jsou dostupné v několika provedeních s různým počtem jamek (6 jamek, 12 jamek, 24 jamek, 96 jamek, 384 jamek...). Podle počtu jamek se následně odvíjí maximální objem, jenž je možné do jamek nanést pipetou. V případě 96 jamkové destičky je maximální objem okolo 300 μ l, zatímco u 384 jamkové destičky je maximální objem pouze 100 μ l.

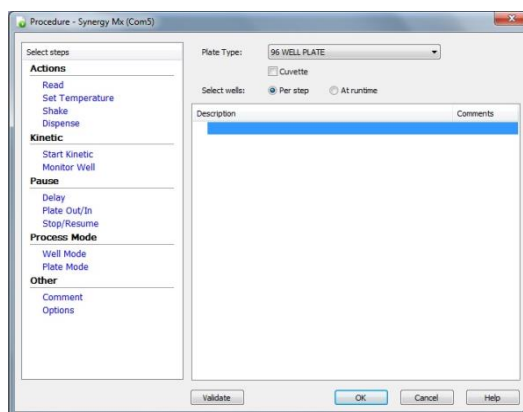
Nastavení automatického spektrometru Synergy MX

Automatický spektrometr Synergy MX (BioTek Instruments, USA) umožňuje měření absorbance, luminiscence a fluorescence na mikrotitračních destičkách. Tento přístroj je dodáván spolu se softwarem Gen5™. Program Gen5 pracuje se dvěma pojmy: Protokol a Experiment. Protokol lze chápat jako šablónu pro měření a Experiment jako samotné měření včetně získaných dat. Po otevření se zobrazí, následující dialogové okno:



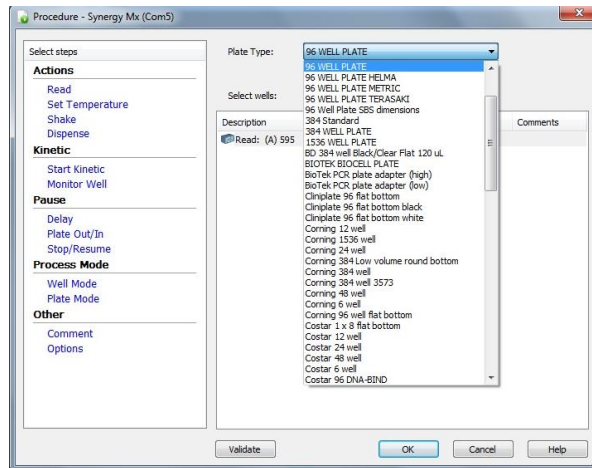
Obrázek 2: Dialogové okno, jež se zobrazí po spuštění programu Gen5.

Zde vytvořte nový protokol tlačítkem New. Následuje definování procedury měření, jak je zobrazeno na obrázku 3.



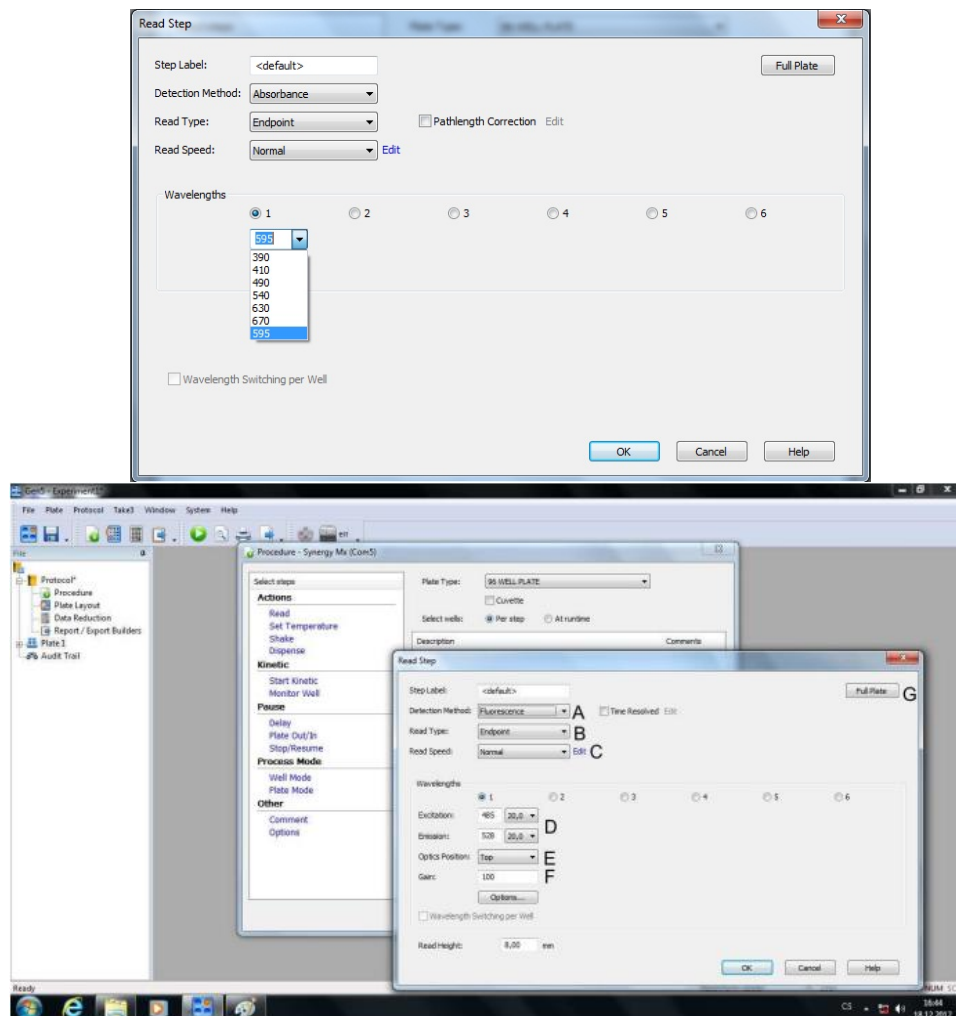
Obrázek 3: Okno pro nadefinování jednotlivých kroků měření.

V horní části okna je umístěna rolovací lišta pro výběr typu destičky. Zde zvolte přesný typ a počet jamek destičky, na které budou měření uskutečněna.



Obrázek 4: Rolovací lišta pro výběr destičky.

Položka „Read“ v levé části okna umožňuje zadání jednotlivých kroků, které budou provedeny v rámci daného úkolu. Po kliknutí na tuto položku dostanete další okno, kde je možné blíže specifikovat měření. Při zadávání měření fluorescence a absorbance jsou okna mírně odlišná, proto jsou uvedena níže.



Obrázek 5: Okno pro definování požadované procedury pro měření absorbance a fluorescence.

A - rolovací okno pro výběr spektrálního měření.

B – nastavení snímání spektra nebo měření na fluorescence v pevných bodech. Měření v pevných bodech umožňuje nastavení 6 různých vlnových délek.

C – Rychlost snímání pro fluorescenční měření.

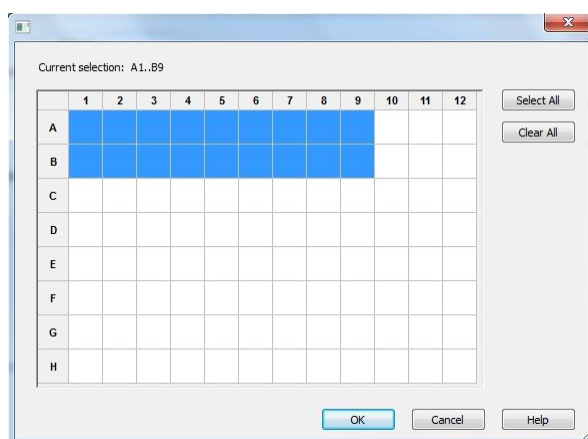
D – Nastavení vlnové délky excitace a emise pro měření fluorescence.

E – Nastavení pozice optiky.

F – Nastavení elektronického zesílení signálu (parametr fotodiody).

G – Nastavení rozsahu snímaných jamek.

Během zadávání procedury je možné zvolit, které jamky budou změřeny. Vybranou oblast je možné vybrat tažením kurzorem myši. Není možné vybrat dvě jamky, mezi nimiž je jiná jamka.



Obrázek 6: Vybrání měřené oblasti.

Jednotlivé kroky odsouhlaste pomocí OK tlačítek. Samotné měření zahájíte kliknutím na bílou šipku v zeleném kolečku.

Úkol č. 1

1. Seznamte se s funkcemi přístroje a jeho nastavením.
2. Připravte si roztoky proteinu pro kalibraci a další nutné chemikálie.
3. Změřte kalibrační řadu.
4. Určete koncentraci neznámého proteinu, včetně stanovení směrodatné odchylky tohoto měření.
5. Diskutujte získané výsledky.

Postup

1. Připravte si borátový pufr, pH 8,5: 0,75 g kyseliny borité a 1,2 g tetraborátu sodného do 50 ml vody.
2. Připravte roztok reaktantu: 1,5 mg fluorescaminu do 5 ml 100% acetonu. Vyvarujte se kontaktu acetonu s vodou (například mokré chemické sklo).
3. Nachystejte si roztok BSA o koncentraci 1 mg/ml a z něj poté roztoky pro kalibrační řadu podle níže uvedené tabulky.

koncentrace albuminu mg/ml	albumin (μ l)	voda (μ l)
0	0	1000
0,2	200	800
0,4	400	600
0,6	600	400
0,8	800	200
1	1000	0

4. Do čisté mikrozkušavky napipetujte 100 μ l roztoku BSA nebo neznámého proteinu, následně přidejte 1050 μ l borátového pufru.
5. Dobře promíchejte pomocí vortexu.
6. K proteinu v pufru za stálého třepání přidejte 100 μ l roztoku fluorescaminu.
7. Nechejte minimálně 2 minuty inkubovat. Postup zopakujte pro všechny vzorky.
8. Následně pipetujte v dubletu 250 μ l každého roztoku kalibrační řady a v tripletu 250 μ l neznámého vzorku do mikrotitrační destičky.
9. Změřte fluorescenci ($\lambda_{\text{ex}}=390$ nm, $\lambda_{\text{em}}=465$ nm).
10. Vytvořte kalibrační přímkou.
11. Stanovte přibližnou koncentraci neznámého proteinu.

Úkol č. 2

1. Připravte si roztoky proteinu pro kalibraci a další nutné chemikálie.
2. Změřte kalibrační řadu.
3. Určete koncentraci neznámého proteinu, včetně stanovení směrodatné odchylky tohoto měření.
4. Diskutujte získané výsledky.

Postup

1. Ředěním si připravte činidlo Bradfordové.
2. Nachystejte si roztok BSA o koncentraci 1 mg/ml a z něj poté pipetujte v dubletu kalibrační řadu podle níže uvedené tabulky.

koncentrace albuminu mg/ml	albumin (μ l)	voda (μ l)
0	0	10
0,1	1	9
0,2	2	8
0,3	3	7
0,4	4	6
0,5	5	5
1	10	0

3. V tripletu pipetujte do mikrotitrační destičky 2 μ l neznámého vzorku s 8 μ l vody.
4. Do každé jamky přidejte 200 μ l zředěného činidla Bradfordové.
5. Změřte absorbanci při 595 nm.
6. Vytvořte kalibrační přímkou.
7. Stanovte přibližnou koncentraci neznámého proteinu.
8. Porovnejte přesnost měření obou metod a výsledek diskutujte.

Přístroje a pomůcky: automatický spektrometr pro měření na mikrotitračních destičkách Synergy MX (BioTek Instruments, USA), vortex, mikrotitrační destička (96 jamek), pipety, kádinky.

Chemikálie: albumin z hovězího séra (0,1 mg/ml), deionizovaná voda, fluorescamin, kyselina boritá, tetraborát sodný, 100% aceton, činidlo Bradfordové, roztok proteinu o neznámé koncentraci.