APLIKOVANÁ BIOLÓGIA I · PRACOVNÝ ZOŠIT

Stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou

Rozpustenie proteínov z cvičenia č. 6 v IEF roztoku → kalibračná krivka s albumínom → reakcia s CBB G-250 → A_{595}

ROZTOKY A VZORKY

- **Proteíny z cv. č. 6** 3 skúmavky (E1–E3)
- **IEF roztok** 3 × 100–200 µl + na štandardy a blank ≈ 0,5 ml
  8 M močovina · 2 M tiomočovina · 2 % CHAPS · 50 mM DTT
- **Bradfordovo činidlo** ≈ 26 ml (1 ml / skúmavku)
- **Vaječný albumín** 0,01 g + 1 ml dest. vody

POMÔCKY

- chladená centrifúga
- mikroskúmavky 1,5 ml – ≈ 35 ks
- automatické pipety 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl
- stolová trepačka (vortex)
- plastové kyvety 1 cm
- Spectroquant Pharo 300 · Excel

ČAS

≈ 3 h

kalibračná krivka sa robí počas 1 h rozpúšťania

Paralelný postup: časť **B** (kalibračná krivka) robte počas 1 h rozpúšťania proteínov v kroku 6 časti A. Časť **C** meria vzorky aj štandardy spolu.

A Príprava vzoriek

proteíny z cvičenia č. 6

POSTUP

1 

Rozmrazte IEF roztok

Vyberte IEF roztok z mrazničky a nechajte ho **pomaly** rozmraziť pri laboratórnej teplote.

2 



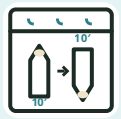
Centrifugujte proteíny z cvičenia č. 6

Skúmavky E1–E3 vyberte z mrazničky. Centrifugujte vo vychladenej centrifúge pri **+4 °C** a **max. otáčkach** **10 min**.

3 

Zlejte acetón

Acetónový supernatant zlejte do **odpadovej nádoby na acetón**. Proteíny zostanú na dne skúmavky.

4 

Odparte zvyšný acetón

Otvorenú skúmavku nechajte v digestore **10 min** **hore dnom** a **10 min** **dnom dole**.

5 



Pridajte roztok na rozpustenie proteínov (IEF)

Pridajte **100 µl** IEF roztoku. Ak je to potrebné, pridajte ďalších **50–100 µl**. **Zapíšte celkový objem V_{IEF}.**

⚠ BEZPEČNOSŤ · PRÁCA · LIKVIDÁCIA

IEF roztok

Tiomočovina (H302 · H351 · H361d · H411) a DTT (H302 · H315 · H319) – škodlivý pri požití; podozrenie na rakovinu a poškodenie plodu; toxický pre vodné organizmy.

- Rukavice a okuliare; nedostať na kožu, po kontakte umyť.
- Skúmavku otvárať v digestore – DTT zapácha.

Nezahrievať – močovina sa rozkladá a mení proteíny. Tehotné s tiomočovinou nepracujú.

Acetón v skúmavke

- Uzávery dotiahnuť, skúmavky **vyvážiť**; centrifúgu vopred vychladiť na +4 °C.

„Najvyššie otáčky“ = max. povolené pre 15 ml skúmavku a rotor (pozri značenie).

Acetón – odpad

- Zliať do **nádoby na acetón** (nehalogénované org. rozpúšťadlá). Zlievať v digestore, pomaly, aby sa neextrahované proteíny neuvoľnili.

Odparovanie acetónu

- Len **v digestore** so zapnutým odťahom.
- Žiadny plameň ani varič v digestore.

Proteíny nevysušiť úplne – horšie sa potom rozpúšťajú.

6  

Rozpúšťajte 1 h

Pri laboratórnej teplote **1 h**. Občas rozsuspendujte prepipetovaním. **Medzitým pripravte kalibračnú krivku (časť B).**

7  

Centrifugujte a preneste rozpustené proteíny

Centrifugujte priamo v 15 ml skúmavke: **6 000 g** · **10 min** · laboratórna teplota. Supernatant prepipetujte do **novej mikroskúmavky** (E1–E3). Nerozpustený materiál nechajte na dne.

Centrifugácia

Overte, že 15 ml skúmavka aj rotor znesú 6 000 g; nezabudnite vyvážiť.

B Kalibračná krivka

počas kroku 6

8 

Pripravte zásobný roztok BSA

Rozpustite **0,01 g** BSA v **1 ml** destilovanej vody → **10 mg/ml**.

Vaječný albumín

Možný alergén – prášok vážiť opatrne, nevdychovať. Pri alergii na vajcia pracovať v rukaviciach.

9  

Narieďte 5 štandardných roztokov

Do 5 mikroskúmaviek napipetujte štandard a IEF roztok podľa schémy nižšie. Spolu vždy **100 µl**.

> Objemy 2–10 µl pipetujte pipetou s rozsahom **0,5–10 µl**. Štandardy sa riedia v IEF.

IEF roztok

Obsahuje tiomočovinu – rukavice, pozri krok 1. Zvyšky → toxický vodný odpad.

Riedenie štandardov BSA (Tab. 1) – spolu vždy 100 µl



10 mg/ml	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,6 mg/ml	0,8 mg/ml	1,0 mg/ml
0,01 g / 1 ml dest. voda	2 µl štandardu 98 µl IEF	4 µl štandardu 96 µl IEF	6 µl štandardu 94 µl IEF	8 µl štandardu 92 µl IEF	10 µl štandardu 90 µl IEF

C Reakcia s činidlom a meranie

štandardy a vzorky spolu

R 

Bradfordovo činidlo AK NIE JE PRIPRAVENÉ

0,02 g CBB G-250 rozpustite v **10 ml** 96 % etanolu, pridajte **20 ml** 85 % H_3PO_4, doplňte destilovanou vodou do **200 ml** a prefiltrujte cez filtračný papier.

H_3PO_4 85 %

H290 · H314 – spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.

Okuliare a rukavice, pracovať v digestore.

Kyselinu pridávať **do** etanolového roztoku, nie naopak; potom riediť vodou.

Etanol 96 %

H225 · H319 – veľmi horľavý; mimo plameňa.

10  

Napipetujte reakčné zmesi

Do každej 1,5 ml mikroskúmavky dajte **5 µl** roztoku a **1 ml** Bradfordovho činidla.

Pripravte:

- **štandardy**: 5 koncentrácií × 3 opakovania = 15
- **vzorky**: 3 extrakty × 3 opakovania = 9
- **blank**: 5 µl IEF + 1 ml činidla

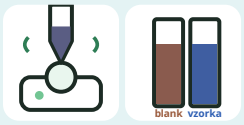
Bradfordovo činidlo

~ 9 % H_3PO_4 + 5 % etanol + CBB – dráždi kožu a oči; CBB farbí kožu, odev aj sklo.

Rukavice, okuliare a plášť.

1 ml dávkovať automatickou pipetou alebo dávkovačom.

11 Premiešajte, preneste do kyviet a inkubujte



Premiešajte na stolovej trepačke, preneste do kyviet a inkubujte **10 min** pri laboratórnej teplote. Farba sa mení z hnedočervenej na **modrú**.

Kyvety

Komplex CBB–proteín sa viaže na sklo – použite **plastové jednorazové** kyvety (PS, 1 cm).

Kyvetu chytajte za matné steny; optické steny bez odtlačkov.

12 Zmerajte absorbanciu



Spektrofotometer · **595 nm** · proti blanku. Merajte do ~60 min od pridania činidla, komplex sa potom zráža.

Po meraní

Obsah kyviet → **tekutý chemický odpad** (obsahuje aj IEF roztok s tiomočovinou).

Kyvety a mikroskúmavky → **pevný odpad**.

13 Zostrojte kalibračnú krivku a vypočítajte koncentráciu



- Vypočítajte **priemerné A_{595}** každého štandardu (3 opakovania).
- V Exceli zostrojte graf A = f(c), pridajte lineárnu spojnicu trendu s rovnicou a R^2.
- Z priemerného A každého extraktu vypočítajte koncentráciu:

$$c\ (mg/ml) = (A_{595} - q) / k$$

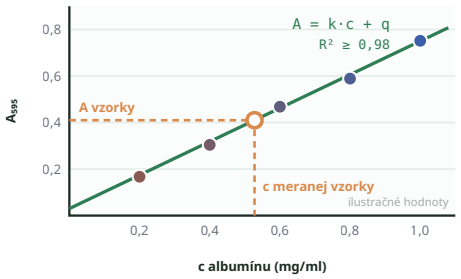
Voliteľne – obsah proteínov v semene:

$m\ (mg) = c \cdot V_{IEF}\ (ml) \cdot 1{,}5 / V_{extraktu}$ (V z cv. č. 6 – korekcia, ak sa nepreniesol celý 1,5 ml extrakt)

obsah (%) = m / navážka (≈ 100 mg) · 100 → porovnajte s 10–15 % v jačmeni.

Ak A vzorky presahuje najvyššiu hranicu, extrakt narieďte IEF roztokom a meranie zopakujte.

Kalibračná krivka – ako ju čítať



Záznamový hárok do protokolu

Kalibrácia – A_{595}

	A_1	A_2	A_3	Ø A
0,2 mg/ml				
0,4 mg/ml				
0,6 mg/ml				
0,8 mg/ml				
1,0 mg/ml				

Rovnica: A = _____ · c + _____ R^2 = _____

Vzorky

	V_{IEF} (ml)	A_1	A_2	A_3	Ø A	c (mg/ml)	obsah (%)
Extrakt E1							
Extrakt E2							
Extrakt E3							

Použitá literatúra

Bradford (1976) https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Podporené projektom

KEGA 012UCM-4/2025