

Komplex Biolabor II. jegyzőkönyv

Csoma Borbála
ZZMDFE

2020.02.20.
ITK 324 biomikrofluidika labor

Fehérjekoncentráció meghatározása hígítási sorral

Bevezetés

Az első laborgyakorlat célja a fehérjekoncentráció meghatározása volt, hígítási sor készítésével. Az elkészített hígítási sorokban az oldatok abszorbanciáját mértük, különböző műszerekkel.

Felhasznált anyagok, eszközök

- kék színnel jelölt pipetta (100-1000 μ l mérettartomány)
- sárga színnel jelölt pipetta (10-100 μ l mérettartomány)
- 96 well plate
- fehérje törzsoldat
- Bradford reagens
- desztillált víz
- Thermo Scientific NanoDrop
- TECAN SPARK 20M

A gyakorlat menete

A gyakorlat során párokban, fejenként 4 db, 6 pontos felező hígítási sort készítettünk, 96 well plate-en.

A hígítási sorhoz 2 mg/ml koncentrációjú fehérje törzsoldattal dolgoztunk. Az anyagok pontos kiméréséhez 2 különböző mérettartományú pipettát használtunk. Ehhez felelevenítettük a pipetta helyes használatának lépéseit.

A pipetta használata

1. a megfelelő mérettartományú pipetta kiválasztása
2. beállítjuk a kívánt mennyiséget
3. a pipettahegy felvétele (a pipetta mérete alapján)
4. gomb lenyomása az első ütközésig
5. a pipettahegy folyadékba merítése 2-3 mm mélyen
6. a nyomógomb lassú felengedése (így lehet biztosítani, hogy ne kerüljenek légbuborékok a pipetta hegyébe)
7. a folyadék kiengedése: a gombot lassan lenyomjuk az első, majd a második ütközésig míg a folyadék teljesen kiürül a pipettahegyből
8. a pipettahegy eltávolítása

Az elkészített hígítási sor abszorbanciáját először NanoDrop 2000 spektrofotométerrel mértük. Ezek után minden második sorhoz Bradford-reagenst adtunk, majd a teljes plate abszorbanciáját mértük, Tecan Spark 20M műszerrel.

Hígítási sor készítése

Minden hallgató 4 hígítási sort készített, az alábbi módon:

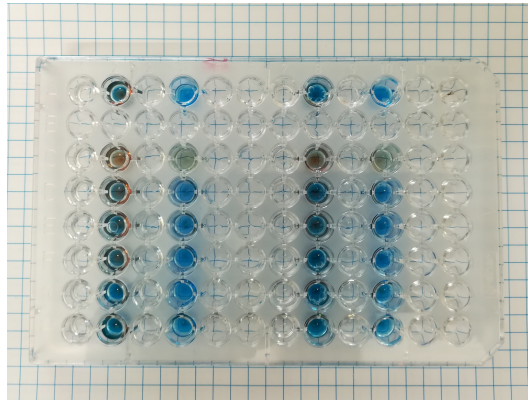
- törzsoldat + víz (100 μ l)
- törzsoldat + víz + Bradford (120 μ l)
- törzsoldat + víz (50 μ l)
- törzsoldat + víz + Bradford (60 μ l)

Az anyagok pontos arányát az 1 táblázat tartalmazza.

	7. oszlop	8. oszlop	9. oszlop	10. oszlop
A	ism. minta 100 μ l	ism. minta 100 μ l + 20 μ l Bradford	ism. minta 50 μ l	ism. minta 50 μ l + 10 μ l Bradford
B	üres	üres	üres	üres
C	100 μ l blank	100 μ l blank + 20 μ l Bradford	50 μ l blank	50 μ l blank + 10 μ l Bradford
D	100 μ l 0,125 mg/ml	100 μ l 0,125 mg/ml + 20 μ l Bradford	50 μ l 0,125 mg/ml	50 μ l 0,125 mg/ml + 10 μ l Bradford
E	100 μ l 0,25 mg/ml	100 μ l 0,25 mg/ml + 20 μ l Bradford	50 μ l 0,25 mg/ml	50 μ l 0,25 mg/ml + 10 μ l Bradford
F	100 μ l 0,5 mg/ml	100 μ l 0,5 mg/ml + 20 μ l Bradford	50 μ l 0,5 mg/ml	50 μ l 0,5 mg/ml + 10 μ l Bradford
G	100 μ l 1 mg/ml	100 μ l 1 mg/ml + 20 μ l Bradford	50 μ l 1 mg/ml	50 μ l 1 mg/ml + 10 μ l Bradford
H	100 μ l 2 mg/ml	100 μ l 2 mg/ml + 20 μ l Bradford	50 μ l 2 mg/ml	50 μ l 2 mg/ml + 10 μ l Bradford

1. táblázat. A 4 hígítási sor

A kapott hígítási sorokat a 1 ábra mutatja be. (Az 1, 2, 3, 4-es oszlopokat mérőpartnerem, Szakadati Helga készítette a 1 táblázat értékeit követve.)



1. ábra. A plate a hígítási sor elkészítése után

Mérés – NanoDrop 2000 spektrofotométer

Az egyes oldatok abszorbanciának méréséhez először NanoDrop műszert használtunk, mely egyetlen csepp ($2\ \mu\text{l}$) folyadék elnyelési tulajdonságait méri. A felület tisztítása után a blank (C3-as cellában lévő) folyadékkal nulláztam a mérőműszert. Ezt követően, a legalacsonyabb koncentrációtól, a legmagasabb felé haladva megmértem az oldatok abszorbanciáját 280 nm-en. Végül, a pipetta hegyének cseréje után, az ismeretlen fehérje abszorbanciáját is lemértem. Minden mérés között letakarítottam a műszer felületét. A kapott eredményeket a 2 táblázat tartalmazza.

Minta koordináta	Abs280
C3	0,0034
D3	0,0094
E3	0,0175
F3	0,0323
G3	0,0611
H3	0,1215
ismeretlen fehérje	0,0645

2. táblázat. Az 3. hígítási sor abszorbanciája 280 nm-en

Mérés-TECAN Spark 20M

Miután minden második hígítási sorhoz Bradford-reagenst adtunk, a plate-et Tecan műszerbe helyeztük, mely megmérte az oldataink abszorbanciáját 280, 465 és 595 nm-en. A "sima" oldatok esetében a 280 nm-en, a Bradford-reagenst tartalmazó oldatok abszorbanciáját pedig 595 nm-en számolom.

A három mérési eredményt a 2, 3, 4 ábrák tartalmazzák. Az általam készített hígítási sorok eredményeit félkövérrel emeltem ki.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,9348	3,2265	3,0362	3,0819	3,3499	3,3674	2,909	3,4183	2,9882	3,2602	3,5508	3,6178
B	3,4401	3,508	3,5027	3,2905	3,4146	3,4188	3,4676	3,4619	3,4397	3,3813	3,4968	3,4378
C	2,9503	3,166	2,8721	3,0206	3,4718	3,3966	2,8821	3,1857	2,9373	3,2428	3,3937	3,4278
D	2,9301	3,1937	2,8778	3,0646	3,4301	3,4148	2,8033	3,2469	2,8592	3,1364	3,4607	3,4769
E	2,9187	3,282	2,8538	3,1112	3,4734	3,3547	2,7951	3,168	2,9446	3,1534	3,4717	3,4798
F	2,9793	3,2225	2,9731	3,1191	3,4342	3,4196	2,8454	3,2272	2,869	3,2735	3,458	3,3913
G	3,05	3,2107	2,8792	3,1419	3,5241	3,5082	2,8967	3,3883	2,9936	3,214	3,4064	3,4463
H	3,1102	3,2709	3,1059	3,2556	3,4834	3,5678	3,0244	3,3654	3,0777	3,4065	3,4143	3,4172

2. ábra. A kapott eredmények 280 nm-en

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1766	1,0088	0,1564	0,2207	0,4591	0,5387	0,1238	0,7495	0,1348	0,3262	0,65	0,6052
B	0,616	0,654	0,6854	0,4348	0,5827	0,5671	0,6859	0,6634	0,6588	0,578	0,5832	0,5144
C	0,2963	1,1315	0,1263	0,4536	0,7435	0,5858	0,1163	1,2661	0,168	0,6788	0,5812	0,522
D	0,2377	1,0356	0,1276	0,4005	0,5998	0,6041	0,1303	1,009	0,1395	0,4842	0,5883	0,5526
E	0,1939	1,117	0,1164	0,4702	0,616	0,4834	0,1084	1,0824	0,1629	0,4834	0,6187	0,6
F	0,2129	1,1216	0,1043	0,3739	0,6708	0,6143	0,1233	0,7761	0,1226	0,5319	0,6237	0,5371
G	0,2592	0,8118	0,0965	0,2251	0,6411	0,6664	0,114	0,8328	0,1486	0,5807	0,5922	0,5623
H	0,2903	1,096	0,1318	0,4485	0,6178	0,6841	0,1298	0,7536	0,1633	0,5866	0,5066	0,5205

3. ábra. A kapott eredmények 465 nm-en

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1577	0,9557	0,1483	1,1575	0,425	0,5078	0,1087	1,5236	0,119	1,4182	0,6061	0,5519
B	0,5824	0,609	0,6488	0,4039	0,5439	0,5333	0,6578	0,625	0,6401	0,5582	0,5462	0,4779
C	0,2662	0,5421	0,114	0,3727	0,6989	0,5532	0,0971	0,6335	0,148	0,4703	0,5488	0,4923
D	0,2094	0,8231	0,1122	0,8755	0,5568	0,5695	0,1104	1,0824	0,1252	0,9312	0,552	0,5211
E	0,1733	1,0867	0,1032	0,9546	0,5759	0,4433	0,1022	0,9582	0,1437	1,0003	0,5848	0,5683
F	0,1893	0,9561	0,0892	1,1071	0,6327	0,571	0,1086	1,2586	0,1067	1,2451	0,5909	0,5126
G	0,231	1,3301	0,0845	1,1548	0,6028	0,6243	0,0994	1,4144	0,1302	0,927	0,5803	0,5384
H	0,2588	1,4256	0,1136	1,1366	0,5782	0,6437	0,1134	1,4145	0,143	1,2784	0,4968	0,4995

4. ábra. A kapott eredmények 595 nm-en

A mérés kiértékelése

A mérések elvégzése után a kapott eredményeket (abszorbancia) a koncentráció függvényében grafikonon ábrázoltam, majd lineáris kalibrációs görbét illesztettem a kapott pontokra. A kapott egyenes alapján a grafikonon feltüntettem az egyenes egyenletét, valamint R^2 -et. A kapott kalibrációs görbéket a 6, 7, 8 és a 9 ábrák mutatják be.

A 8. és 10. hígítási sor kalibrációs görbéjének számolásakor az eredeti koncentrációkat korrigáltam a hozzáadott Bradford-reagens mennyisége alapján. A H cellában lévő koncentráció így $(100 * 2)/120 = 1,667$ mg/ml -re változik (az 50 μ l-es esetben is), ezt az első esethez hasonlóan felezem a további cellákban.

Az egyenes egyenlete alapján visszszámoltam az ismeretlen fehérjeoldat koncentrációját:

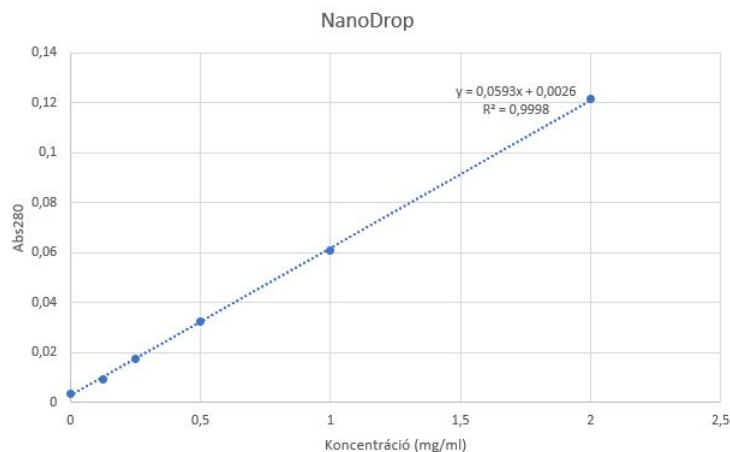
kapott abszorbancia = y $\rightarrow$ az egyenlet alapján megkaptam x (koncentráció) értékét

Az eredményeket a 3 táblázat tartalmazza.

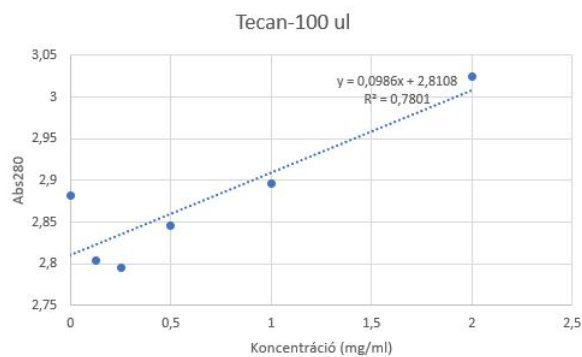
Mérési módszer	Koncentráció (mg/ml)
NanoDrop 50 μ l, 280 nm	1,044
Tecan 100 μ l, 280 nm	0,996
Tecan 100 μ l, 595 nm	1,599
Tecan 50 μ l, 280 nm	1,099
Tecan 50 μ l, 595 nm	2,042

3. táblázat. Az ismeretlen fehérjeoldat koncentrációja a különböző mérési eredmények alapján

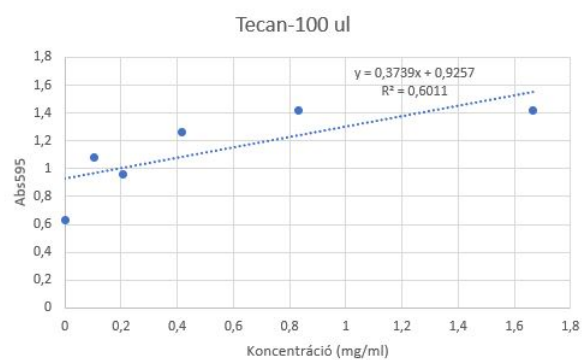
A kapott eredmények átlaga: 1,356 mg/ml, szórása: 0,453



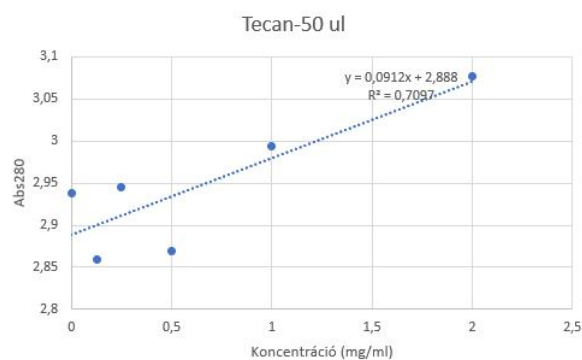
5. ábra. A 3. hígítási sor kalibrációs görbéje a NanoDrop műszerrel végzett mérés alapján.



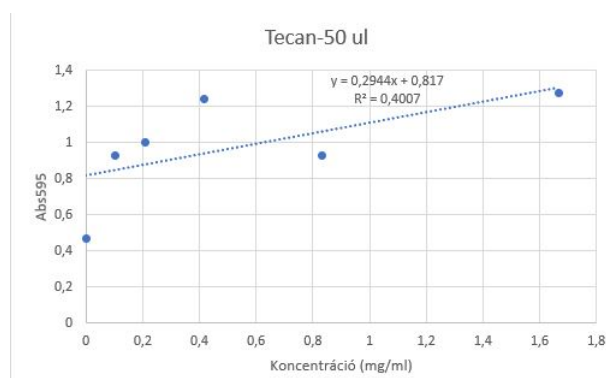
6. ábra. A 7. hígítási sor kalibrációs görbéje a Tecan műszerrel végzett mérés alapján.



7. ábra. A 8. hígítási sor kalibrációs görbéje a Tecan műszerrel végzett mérés alapján.



8. ábra. A 9. hígítási sor kalibrációs görbéje a Tecan műszerrel végzett mérés alapján.



9. ábra. A 10. hígítási sor kalibrációs görbéje a Tecan műszerrel végzett mérés alapján.