

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

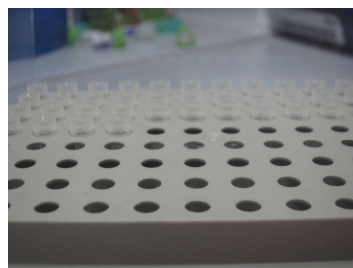
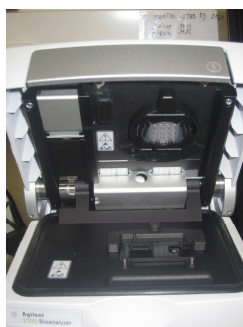
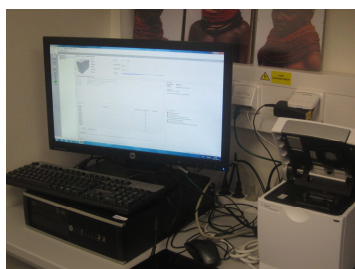
FAKULTA TROPICKÉHO ZEMĚDĚLSTVÍ

Katedra tropických plodin a agrolesnictví

Laboratoř molekulární biologie

Laboratorní úlohy pro práci s přístrojem Agilent 2100

Bioanalyzer – Protokol pro analýzu proteinů



Praha

2013

Poděkování

Tvorba protokolů **“Laboratorní úlohy pro práci s přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer – Protokol pro analýzu proteinů”** byla finančně podpořena Fondem rozvoje vysokých škol a zpracována v rámci projektu FRVŠ reg. číslo 1397/2013 **“Inovace vybavení laboratoří pro výuku aplikovaných rostlinných biotechnologií”**

OBSAH

1. Pravidla bezpečnosti práce v Laboratoři molekulární biologie.....	4
2. Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit – návod k použití	5
Protokol pro čipovou analýzu proteinů	5
Princip analýzy	5
Kity pro stanovení proteinů.....	5
Podmínky pro skladování kitu.....	5
Předpoklady pro správný průběh analýzy	5
Požadavky na materiál	5
3. Nastavení prajmovací stanice.....	6
4. Základní úkony při měření	7
5. Protokol analýzy proteinů	8
Příprava denaturovaného roztoku.....	8
Naředění vzorků proteinu	8
Příprava vzorků a žebříku k analýze	8
Nanášení gelu na čip	8
Nanášení žebříku a vzorků na čip	9

1. Pravidla bezpečnosti práce v Laboratoři molekulární biologie

- Před začátkem práce v laboratoři by studenti měli znát pravidla práce a bezpečnosti v Laboratoři molekulární biologie.
- V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.
- Studenti musí mít pláště, přezůvky a rukavice.
- Nepovolené experimenty jsou přísně zakázány.
- Udržujte laboratoř čistou a uklizenou.
- Zkontrolujte přístroje. Pokud je jakýkoliv problém s přístroji, nepoužívejte ho a informujte školitele.
- Pokud při používání část vybavení selže, okamžitě informujte školitele. Nikdy se nepokoušejte vyřešit problém sami, protože byste mohli zranit nejen sebe ale i ostatní.
- Před odchodem z laboratoře po sobě uklid' pracovní plochu.
- Před odchodem z laboratoře vypněte všechny elektrické přístroje a umyjte si ruce.
- Pokud máte nějaké pochyby, zeptejte se školitele.
- Pozorně čtěte etikety.
- Nikdy přímo nepřičichávejte k látkám. Přečtěte si etiketu (pro zjištění obsahu). Nikdy neochutnávejte chemikálie!
- Zjistěte, kde je v laboratoři umístěn hasicí přístroj a zdroj vody a jak je používat.
- Zaměstnanci a studenti jsou povinni manipulovat jedovatými, těkavými a páchnoucími látkami výhradně v digestoři.
- Používané chemikálie a reagentie vracíte vždy na místo, odkud jste je vzali.
- Zvláštní opatrnosti je třeba dbát při manipulaci s otevřeným ohněm, hořlavinami, žíravinami a jedovatými látkami.
- Nehody nebo poranění hlase ihned školiteli a v případě potřeby poskytněte okamžitě první pomoc.
- Reagenční roztoky se odlévají z reagenčních lahví na straně odvrácené od signatury tak, aby se nepoškodil štítek na láhvi. Nečitelný nápis a s tím spojená případná záměna může mít nebezpečné následky.
- Koncentrované kyseliny, zvláště kyselina sírová, se ředí vléváním kyseliny do vody. Kyselina se přilévá tenkým proudem a za stálého promíchávání roztoku skleněnou tyčinkou.
- S látkami dráždivými, páchnoucími a jedovatými (např. chlor, chloroform, sirouhlík, aj.) a s látkami snadno vznětlivými (např. benzin, aceton, aj.) se musí pracovat v dobře odsávané a zapojené digestoři.
- Toxický i netoxický odpad vyhazujte do nádob k tomu určených!
- Všichni, kteří v laboratoři pracují, budou respektovat výše uvedená pravidla a budou se řádně zapisovat do prezenční knihy.

2. Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit – návod k použití

Protokol pro čipovou analýzu proteinů

Zkontrolujte, zda Agilent DNA 1000 kit obsahuje následující položky

High Sensitivity Protein Chips

10 Čipů

1 Elektrodotový čistič

Syringe Kit

1 injektor

Reagencie (pro separaci)

● (red) Gel Matrix (1 lahvička)

● (purple) Destaining Solution (1 lahvička)

○ (white) DNA Gel Matrix (3 lahvičky)

3 Spin filtrační zkumavky

Princip analýzy

Agilent High Sensitivity Protein 250 kit obsahuje čipy a reagencie pro stanovení proteinů pomocí fluorescenční barvičky a následným určením velikosti a koncentrace. Pokyny pro práci s Agilent High Sensitivity Protein 250 kit jsou uvedeny manuálu. Tento document popisuje separaci a detekci na čipové elektroforéze.

Kity pro stanovení proteinů

The Agilent High Sensitivity Protein 250 kit je navržen pro stanovení proteinů, analýza detekuje proteiny v rozpětí molekulové hmotnosti od 10 kDa do 250 kDa.

Podmínky pro skladování kitu

- Všechny chemikálie a směsi, které jsou součástí kitu, uchovávejte při teplotě -20°C, aby nedocházelo k jejich znehodnocení
- Vzorkový pufr, odbarvující roztok, barvičkou značený žebřík a protein obsahující barvící složky uchovávejte mimo světlo. Ochranné obaly odstraňujte pouze při pipetování. Pokud jsou tyto látky vystaveny světlu, dojde k jejich znehodnocení.

Předpoklady pro správný průběh analýzy

- Instalace 2100 expert Software Revision B.02.06
- 2100 Bioanalyzer
- Čipová prajmovací stanice

Požadavky na materiál

- 0,5 ml mikrozkušavky
- Deionizovaná voda
- Mikrocentrifuga
- Vortexer
- 1 M Dithiothreitol (DTT) roztok
- 0, 5 ml termoblok nebo vodní lázeň

3. Nastavení prajmovací stanice

1 Vyměňte injektor:

- a** Vyšroubujte použitou injektor z víka prajmovací stanice.
- b** Uvolněte použitou injektor ze svorky a vyhod'te.
- c** Odstraňte plastový obal z nového injektoru a zasuňte do svorky.
- d** Vsuňte do adaptéru a našroubujte do prajmovací stanice.

2 Nastavení základní desky:

- a** Otevřete čipovou prajmovací stanici zatáhnutím západky.
- b** Za použití šroubováku povolte šroubek na spodní straně základní desky.
- c** Zvedněte základní desku a uveďte opět do polohy A, utáhněte šroubek.

3 Nastavení svorky na injektoru:

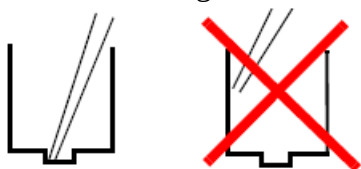
- a** Uvolněte páčku na svorce a posuňte ji na střední pozici.

POZNÁMKA: Pro každý kit vyměňte injektor.



4. Základní úkony při měření

- Zacházejte a uchovávejte všechny chemikálie podle instrukcí uvedených na etiketách jednotlivých balení.
- Vyvarujte se blízkosti zdrojů prachu a jiných kontaminantů v průběhu analýz. Cizí látky v reagentních a vzorcích nebo v přímo v čipu mohou narušit správný průběh analýz a ovlivnit výsledky.
- Uchovávejte všechna činidla a sloučeniny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pokud je právě nepoužíváte.
- Všechna činidla a vzorky nechte ustálit před použitím 30 minut v pokojové teplotě.
- Barvičky a směsi s barvicími látkami chraňte před světlem. Ochranný obal sundávejte pouze při pipetování. Barvičky jsou rozkládány, pokud jsou vystaveny světlu a snižuje se tak intenzita signál.



- Pipetujte vždy tak, aby špička pipety byla na dně jamky. Umístění pipety na stěnu jamky může negativně ovlivnit výsledek.
- S novým kitem vždy použijte novou stříkačku a nový čistič elektrody
- Připravený čip použijte nejpozději do 5 minut, chemické látky se mohou vypařovat a mohlo by to negativně ovlivnit výsledek. °
- Pro analýzu v redukujících podmínkách je nezbytné použít roztok 1M DTT.
- Vzorky musí být před analýzou naředěny, denaturované vzorky již nemůžou být naředěny.
- Nedotýkejte se Agilent 2100 bioanalyzáru v průběhu analýzy a nikdy ho neumísťujte na vibrující povrch.

5. Protokol analýzy proteinů

Příprava denaturovaného roztoku

1 Přidejte 3,5 μ l 1 M Dithiothreitol (DTT) roztoku do vzorkového pufru (100 μ l lahvička s bílou etiketou), nebo přidejte 3,5 Vol-% do alikoty vzorkového pufru v redukujících podmínkách. V neredukujících podmínkách přidejte vodu namísto DTT.

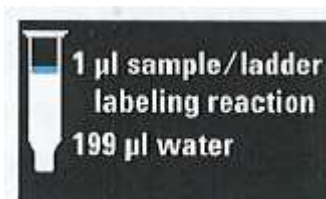
2 Vortexujte 5 s.



Naředění vzorků proteinu

1 Pro přímou analýzu: nařeďte vzorky a žebřík s vodou v poměru 1:200 in water.

2 Označené naředěné vzorky by měly být ihned analyzovány. Nepoužívejte je k analýzám po uskladnění.



Příprava vzorků a žebříku k analýze

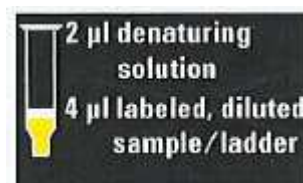
1 Smíchejte 4 μ l označeného, naředěného vzorku proteinu s 2 μ l denaturujícího roztoku (lahvička s bílým štítkem) v 0,5 ml mikrozkušavce.

2 Smíchejte 4 μ l označeného, naředěného vzorku žebříku s 2 μ l denaturujícího roztoku (lahvička s bílým štítkem) v 0,5 ml mikrozkušavce.

3 Připravené vzorky a žebřík z kroku 1 a 2 dejte na 5 min do vodní lázně nebo do termobloku při teplotě 95- 100°C for 5 min. Poté nechte vychladnout.

4 Přesuňte do horní nádoby spin filtrační zkumavky. Tuto zkumavku dejte do centrifugy a stočte 15 s.

Vzorky jsou připraveny k nanesení na čip. Někdy je vhodné připravit si každý vzorek a žebřík dvou opakováních.



Nanášení gelu na čip

1 Nastavte základní desku prajmovací stanice do **pozice A** a píst zacvakněte do **střední** pozice.

2 Vložte nový čip do prajmovací stanice.

3 Pipetujte 12 μ l gelu do jamky označené **G**.

4 Nastavte píst do pozice 1 ml a zavřete prajmovací stanici.

5 Zatlačte píst, dokud ho nezacvakne svorka, počkejte 90 s a uvolněte svorku.

6 Počkejte 5 s. Pomalu zatáhněte píst zpět do pozice 1 ml.

7 Otevřete prajmovací stanici.

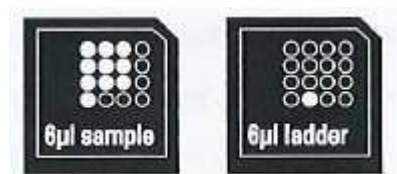
8 Pipetujte 12 μ l gelu do všech zbylých jamek označených **G**.

9 Pipetujte 12 μ l odbarvovacího roztoku do jamky označené **DS**.



Nanášení žebříku a vzorků na čip

- 1 Pipetujte celý objem všech denaturovaných vzorků do příslušných jamek čipu.
- 2 Pipetujte celý objem denaturovaného vzorku žebříku do jamky označené .
- 3 Umístěte čip do bionalyzáru a začněte analýzu během 5 minut.



WARNING: Práce s chemikáliemi

Používejte ochranné pomůcky rukou a očí a dbejte pokynů bezpečné práce v laboratoři. Kit obsahuje následující součásti, které jsou škodlivé lidskému zdraví.
Lithium dodecyl sulfate (LiDS) v roztoku je škodlivý.
Fluorescenční barvička má dráždivé účinky.
