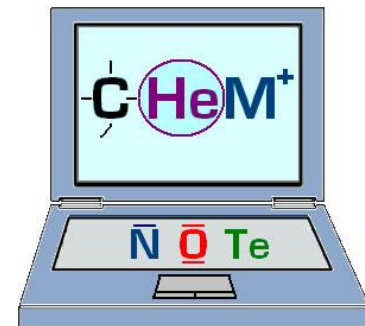




Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



URČOVÁNÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN

- **Interakce s Cu^{2+}**

- Biuretová metoda – chelatace Cu^{2+} imidovými strukturami, vznik červeného komplexu (550 nm), interference – glukosa, amonné sole, některé fosfáty, pro 1-10 mg/ml.
- Hartreeho-Lowryho metoda – modifikovaný biuret, druhou složkou činidla je činidlo na fenoly (polykys. fosfowolframová a fosfomolybdenová), vznik modrého zbarvení, větší citlivost, pro větší rozsah koncentrací.
- bicinchoninová metoda alkalická redukce Cu^{2+} iontu a následné chelataci kys. bicinchoninovou, vznik červeného komplexu, velmi citlivé na podmínky reakce, interference – redukující sacharidy, amonné ionty, citlivost jako Lowry.

- **Ninhydrinová metoda**

- nejprve hydrolýza 6% kys. sírovou, neutralizace, derivatizace ninhydrinem, měří se při 570 nm, kalibrační standard leucin, časově náročné, interference – amonné ionty

- **Stanovení z UV spektra**

- využití absorbance aromatických aminokyselin při 280 nm, pro stanovení čistých proteinů 0,1-1mg/ml, interference – nukleové kyseliny (lze eliminovat současným měřením při 260 nm a korekci)
- absorbance při nižších vlnových délkách – méně časté, pouze pro čisté proteiny, nutné odstranit kyslík z roztoku, interferují mnohé kofaktory

- **Metoda podle Bradfordové**
- vazba Coomassie blue v kyselém prostředí (trifenylnmethanová skup. na nepolární, $-\text{SO}_3^-$ na bazické části), barevná změna (modrá), pro globulární bílkoviny, poměrně hodně interferencí, kalibrační standard BSA, citlivější než Lowry a bicinchoninová.
- **Stanovení celkových proteinů ze sušiny**
- sušení do konstantní hmotnosti při 105°C , nevýhoda – pouze pro velká množství proteinu, nutné odstranit ostatní netěkavé látky.
- Stanovení dostupných SH skupin
- Ellmanovo činidlo – k. 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová (DTNB), vznik thionitrobenzoátu, žlutý (412 nm)
- Stanovení počtu disulfidových vazeb
- Clelandovo činidlo – dithiothreitol a dithioerythritol, vznikne cyklická forma činidla, absorpce při 283 nm
- Stanovení volných aminoskupin
- k. trinitrobenzensulfonová (TNBS), reakce závislá na pH, měří se při 345 nebo 420 nm