

Instrukcja

Przygotowanie ekstraktów

1. Przygotowanie ekstraktów enzymów trawiennych.

Odczynniki:

Kapsułki z ekstraktem enzymów trawiennych.

Uniwersalny bufor Brittona.

Moździerz.

Falcony 50, 14 mL.

Eppendorfy 1.5, 2.0 mL.

Pipety automatyczne regulowane.

Wykonanie:

1-2 kapsułki zawierające ekstrakt enzymów trawiennych rozetrzeć w moździerzu.

Przenieść ekstrakt do falkonów (50mL) i zawiesić w 10,0 mL wybranego buforu o stężeniu 100 mM.

Odwirować nierozpuszczalny osad (5000 rpm, 8 deg C, 15 min).

Supernatant ostrożnie przenieść po 0.5 mL do oznaczonych eppendorfów.

2. Oznaczanie stężenia białek w roztworach.

Odczynniki:

Odczynnik Bradforda.

1 mg/mL Standard białkowy BSA, lizozym.

Falcony 50, 14 mL.

Eppendorfy 1.5, 2.0 mL.

Pipety automatyczne regulowane.

Kuwety do pomiarów spektrofotometrycznych.

Wykonanie:

Odczynnik Bradford rozcieńczyć 1× wodą dejonizowaną.

Przygotować w 2 powtórzeniach 10 rozcieńczeń białka (1,0 mg/mL BSA) do krzywej wzorcowej według schematu:

0.5 mL Odczynnika Bradforda

1.0 mL Wody

50.0 uL Rozcieńczonego białka według schematu:

1: 50.0 uL 1.0 mg/mL BSA + 0.0 uL Wody.

2: 50.0 uL 1.0 mg/mL BSA + 50.0 uL Wody, wymieszać, przenieść 50.0 uL roztworu 2 do kolejnego eppendorfa.

Instrukcja

Przygotowanie ekstraktów

3: 50.0 uL roztworu 2 + 50.0 uL Wody, wymieszać, przenieść 50.0 uL roztworu 3 do kolejnego eppendorfa.

...

10: 50.0 uL roztworu 9 + 50.0 uL Wody, wymieszać, wyrzucić 50.0 uL roztworu 10..

Po 5 minutach zmierzyć absorbancję przy długości fali 595nm.

Narysować krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia białka.

Sprawozdanie:

Wykreślić krzywą wzorcową i określić jej parametry.

Wyznaczyć stężenie ekstraktów białkowych.