

1. Strana 37, Stanovení koncentrace proteinů testovaných neuroblastomových buněčných linií metodou dle Lowryho, doplněné složení roztoků pro stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů analyzovaných vzorů byla stanovena metodou dle Lowryho za použití soupravy pro stanovení koncentrace proteinů od firmy Bio-Rad (USA), kde výrobce přesné složení roztoků z komerčních důvodů neuvádí. Principem této metody je interakce proteinů s měďnatými ionty (biuretová metoda) za vzniku světle modrého komplexu. Po inkubaci je přidáno fenolové činidlo (Folin-Ciocalteu), které obsahuje kyselinu fosfomolybdenovou a fosfowolframovou. Tyto se redukuje zbytky proteinů (Tyr, Trp, Cys) a poskytují sytě modré zbarvení, které je měřeno na spektrofotometru při 750 nm. [74] Nejprve byly vzorky proteinů připravených dle kapitoly 3.2.5 8x ředěny destilovanou vodou. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 5 μ l příslušného vzorku, standardu sérového hovězího albuminu (BSA) o koncentraci 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 a 2,8 mg/ml. „Slepým“ vzorkem o koncentraci BSA 0 mg/ml byla destilovaná voda a pufr RIPA. Do každé jamky se standardem či vzorkem bylo přidáno 25 μ l roztoku A' (1000 μ l reagentu A (pravděpodobně měďnaté ionty) a 20 μ l reagentu S), a poté bylo přidáno 250 μ l reagentu B (fenolové činidlo). Mikrotitrační destička byla umístěna na laboratorní třepačku Labnet Gyro Twiester (USA) a inkubována po dobu 15 min při opatrném míchání při laboratorní teplotě. Následně byla měřena optická denzita na spektrofotometru Molecular Devices VERSA max (USA) při vlnové délce 750 nm. Zjištěná data byla vyhodnocena softwarem SoftMax Pro.