



Uputstvo za pripremu uzoraka za snimanje na spektrometru cirkularnog dihiroizma i optičke rotacijske disperzije

Priprema proteinskih uzoraka

Koncentracija:

Preporučena koncentracija proteina zavisi od veličine proteina, debljine kivete, kao i i tipa merenja. Za standardna 'FAR UV CD' snimanja sekundarne strukture proteina sledeće koncentracije se preporučuju:

0.2 mg/ml konc. proteina u kiveti debljine **1 mm**

0.02 mg/ml konc. proteina u kiveti debljine **10 mm**

ili koncentracija se računa prema dole navedenoj formuli:

$$\text{mol/L} = 115 / (\text{MW} * 7000) * 10 / \text{debljina kivete (mm)}$$

- koncentracija uzorka proteina za snimanje je obrnuto proporcionalna debljini kivete, tako da snimanje u kiveti debljine 1 mm zahteva 10 puta koncentrovaniji uzorak u odnosu na snimanje uzorka proteina u kiveti debljine 10 mm.
- za proteine koji su α -helikoidalne strukture uglavnom je potrebna duplo manja koncentracija za snimanje, dok je za proteine u čijoj strukturi preovladava β -pločica uglavnom potrebna duplo veća koncentracija.
- pre snimanja poželjno je i proveriti apsorbciju uzorka u kiveti debljine 1cm na spektrofotometru, poželjna apsorbcija je između 0.6 i 0.8 na $\lambda = 280$ nm.

Izbor pufera:

Pravilan odabir pufera je veoma važan za precizna CD merenja jer apsorbcija rastvarača može interferirati sa CD signalom. Idealno je da rastvarač ne apsorbuje ni na jednoj talasnoj dužini u rasponu talasnih dužina od 180 – 260 nm u kojem se snimaju 'FAR UV CD' spektri proteina. U prisustvu jona hlora CD signal se gubi na talasnim dužinama manjim od 200 - 195 nm što otežava procenu sekundarnih struktura ali prisustvo hlorida ne interferira sa pikovima na talasnim dužinama $\lambda = 208$ i 222 nm koji su karakteristični za α – heliks i piku na $\lambda = 218$ nm koji je karakterističan za β – nabranu strukturu.

- Puferi koji ne sadrže hloride su poželjni (poželjno je ne koristiti NaCl, Tris...) ali je tolerantno ako se hloridi nalaze u jako niskim koncentracijama.

- Za pripremanje pufera ne koristiti vodu koja je dugo stajala u polietilenskim bocama jer može sadržati tragove aditiva koji potiču od polimera.
- 10 mM K_3PO_4 je dobar izbor uglavnom za sva snimanja, niske koncentracije perhlorata, Tris-a, Na_3PO_4 i borata se mogu tolerisati.
- sulfati⁻ ili fluoridi⁻ su poželjni kontraioni jonima hlorida koji jako apsorbuju na niskim talasnim dužinama.
- DTT, BME ili EDTA mogu biti prisutni u niskim koncentracijama (≤ 1 mM).
- Imidazol jako apsorbuje u dalekoj UV oblasti. Milimolarne koncentracije imidazola umanjuju apsorbanciju koja potiče od mikromolarnih koncentracija proteina.
- Pufer može sadržati do 20 % glicerola ali pri ovoj koncentraciji merenje je ograničeno na talasnu dužinu do 200 nm.
- SDS, Chaps i oktil-glikozid su 'razumno' transparentni deterdženti. Izbegavati Triton-ske deterdžente jer imaju tendenciju da brzo oksiduju i formiraju jedinjenja koji apsorbuju u UV oblasti.
- pH Tris pufera zavisi od temperature, što ga čini lošim izborom prilikom praćenja toplotne denaturacije proteina.
- Za praćenje denaturacije proteina potrebno je koristiti ultračistu ureu ili guanidin.

Filtriranje uzoraka:

Filtriranjem uzoraka i pufera kroz filtre prečnika pora 0.22 ili 0.45 μ m uklanjaju se čestice prašine, mikrobi, agregati proteina i ostale čestice koje mogu ometati CD signal.