

BSA-NO₂ szintézis

Készíteni: 10 mg/ml BSA(Sigma A7906) / dH₂O

Ebből 10x hígítással (dH₂O) készítünk eppendorf csőben 1ml, 1 mg/ml BSA oldatot

1. *Nitrálás peroxinitrittel*

Az eppendorf kupakjába pipetázunk 20µl frissen (jégen) kiolvasztott peroxinitritet (itt: 140 mM), majd a cső kupakját lezárva, fejrefordítva vortexezzük pár másodpercig. Az előbb leírt műveletet azonos körülményeket alkalmazva további két alkalommal megismételjük

Az így kapott nitrált BSA nitrotirozin koncentrációja ha szükséges, a továbblépés előtt meghatározható spektrofotometriásan: pH 9 oldatban 438 nm-en $\epsilon_{NT} = 4300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

2. *Kapcsolási reakció nitrotirozin-etilészterrel (NTEE)*

A reakció előtt a BSA-NT-t egy éjszakán át dializáljuk : MES(Sigma M3671) /HEPES(Sigma H3375) puffer (75:25 v/v %) pH 6

Másnap 45 percig szobahőn inkubáljuk (folyamatos rázatás közben) 5mM NTEE(Fluka 74095) / [MES/HEPES] –rel

A reakciót 10% TCA-val történő kicsapással állítjuk le

A kicsapott proteint centrifugálással összegyűjtjük (RT / 10 min 1000g), a felülúszó eltávolítása után a pelletet alaposan mossuk hideg acetonnal, levegőn száradni hagyjuk, majd feloldjuk 0.1 M NaOH-ban

A nitrotirozin koncentráció a fentiekben leírtak alapján meghatározható