

2 BIELKOVINY

Bielkoviny (proteíny, z gréckeho *prota* = prvotný význam) sú nevyhnutnou súčasťou prakticky všetkých biologických procesov. Význam a obrovský rozsah ich aktivity je ukázaný na niektorých nasledujúcich príkladoch:

1. Enzýmová katalýza. Takmer všetky chemické reakcie v biologických systémoch sú katalyzované špecifickými makromolekulami – enzýmami. Niektoré z nich, ako hydratácia oxidu uhličitého, sú relatívne jednoduché. Iné, ako replikácia celého chromozómu, sú naopak extrémne komplikované. Chemické transformácie *in vivo* prebiehajú bez prítomnosti enzýmov zanedbateľnou rýchlosťou. Enzýmy sú enormne efektívne katalyzátory. Zvyčajne zvyšujú rýchlosť reakcií viac ako 10^6 -krát. Bolo charakterizovaných niekoľko tisíc enzýmov a mnohé z nich boli aj kryštalizované. Je pozoruhodné, že takmer všetky známe enzýmy sú proteíny. Proteíny sú preto centrálnym objektom pri štúdiu chemických transformácií v biologických systémoch.

2. Transport a skladovanie. Množstvo malých molekúl a iónov je transportovaných špecifickými proteínmi. Napríklad, hemoglobín prenáša kyslík v erythrocytoch, zatiaľ čo myoglobín, príbuzný proteín, prenáša kyslík vo svaloch. Železo je prenášané v krvnej plazme pomocou transferínu a je skladované v pečeni v komplexe s feritínom, nepríbuzným proteínom.

3. Koordinovaný pohyb. Proteíny sú hlavným komponentom vo svaloch. Svalová kontrakcia je uskutočňovaná kĺzavým pohybom 2 druhov proteínových filamentov. Podobne, koordinované pohyby - ako pohyb chromozómov počas mitózy a pohon spermíí pomocou flagel, sú tiež uskutočňované kontraktílnym súborom pozostávajúcím z proteínov.

4. Mechanická podpora. Vysoká ťahová sila kože a kostí je dôsledkom prítomnosti kolagénu, fibrilárneho proteínu.

5. Imunitná ochrana. Protilátky sú vysoko špecifické proteíny, ktoré spoznávajú a interagujú s cudzími substanciami ako sú vírusy, baktérie a bunky z iných organizmov. Proteíny takto hrajú podstatnú úlohu v rozlišovaní medzi vlastným a cudzím.

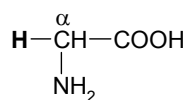
6. Tvorba a prenos nervových impulzov. Odpoveď nervových buniek na špecifické stimuly je sprostredkovaná receptorovými proteínmi. Receptorové proteíny, ktoré môžu byť aktivované špecifickými malými molekulami, ako napr. acetylcholín, sú zodpovedné za prenos nervových impulzov na synapsiách – spojeniach medzi nervovými bunkami.

7. Kontrola rastu a diferenciácia. Kontrolovaná sekvenčná expresia genetickej informácie je základom riadeného rastu a diferenciácie buniek. Iba malá frakcia genómu v bunke je exprimovaná v danom určitom čase. V baktériách sú represorové proteíny dôležitým kontrolným elementom, ktorý utlmuje špecifické segmenty v DNA bunky. Vo vyšších organizmoch sú rast a diferenciácia kontrolované proteínovými rastovými faktormi. Napr. nervový rastový faktor riadi tvorbu neurónových sietí. Aktivita v rozličných bunkách multibunkových organizmov je koordinovaná hormónmi. Mnohé z nich, ako inzulín a tyroid-stimulujúci hormón, sú proteíny. Proteíny slúžia vo všetkých bunkách ako senzory, ktoré kontrolujú tok energie a látok.

Proteíny sú tvorené z 20 aminokyselín

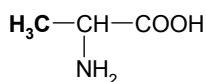
Aminokyseliny sú základnými štrukturálnymi jednotkami proteínu. α -aminokyselina pozostáva z amino skupiny ($-\text{NH}_2$), karboxylovej skupiny ($-\text{COOH}$), vodíkového atómu a rozdielnych R-skupín viazaných na α -uhlíkový atóm (R-skupina označuje bočný reťazec).

Prehľad kódovaných aminokyselín

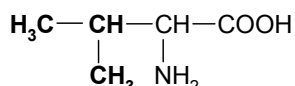


glycín, Gly

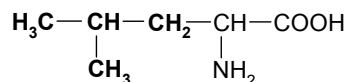
Nepolárne aminokyseliny



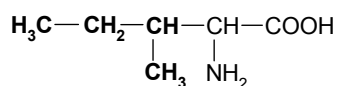
alanín, Ala



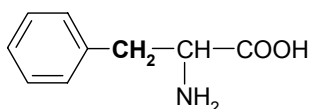
valín, Val



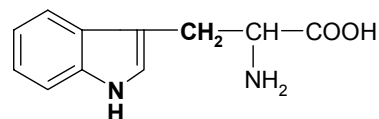
leucín, Leu



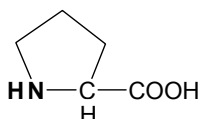
izoleucín, Ile



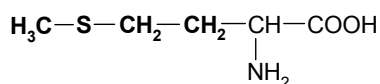
fenylalanín, Phe



tryptofán, Trp

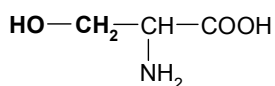


prolín, Pro

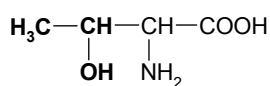


metionín, Met

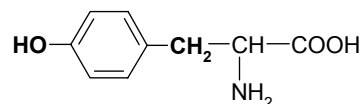
Polárne aminokyseliny



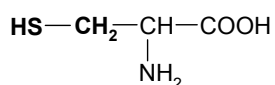
serín, Ser



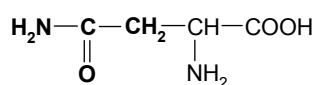
treonín, Thr



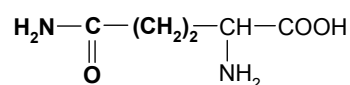
tyrozín, Tyr



cysteinín, Cys

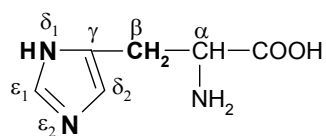


asparagín, Asn

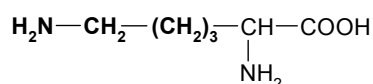


glutamín, Gln

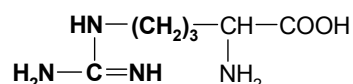
Bázické aminokyseliny



histidín, His

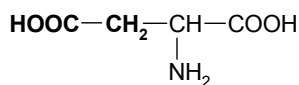


lyzín, Lys

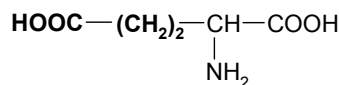


arginín, Arg

Kyslé aminokyseliny



kyselina asparágová, Asp

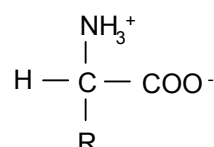
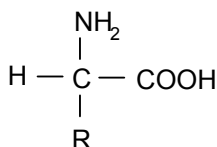


kyselina glutámová, Glu

* šedou farbou sú zvýraznené esenciálne aminokyseliny (pre človeka)

Aminokyseliny v roztoku

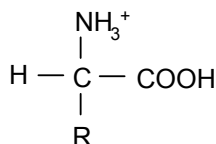
Aminokyseliny sa v roztoku pri neutrálnom pH vyskytujú vo forme dipolárnych iónov - **zwitteriónov** (amfotérny ión, amfión, obojaký ión). V dipolárnej forme aminokyseliny je aminoskupina protonizovaná ($-\text{NH}_3^+$) a karboxylová skupina je disociovaná ($-\text{COO}^-$):



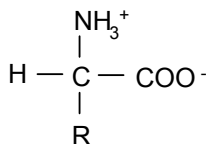
neionizovaná forma aminokyseliny

ionizovaná forma aminokyseliny

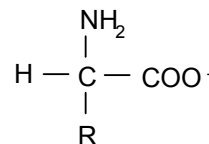
Ionizovaný stav aminokyseliny sa mení s pH:



prevládajúca forma
pri pH 1



prevládajúca forma
pri pH 7



prevládajúca forma
pri pH 11

TABUĽKA 2.1 pK_a hodnoty ionizovateľných skupín v proteínoch *

Skupina	Pozorovaná pK _a
α-amino	6,8 – 8,0
α -karboxylová	3,5 – 4,3
β-karboxylová (Asp)	3,9 – 4,0
γ-karboxylová (Glu)	4,3 – 4,5
δ-guanido (Arg)	12,0
ε-amino (Lys)	10,4 – 11,1
Imidazolová (His)	6,0 – 7,0
Tiolová (Cys)	9,0 – 9,5
Fenolová (Tyr)	10,0 – 10,3

* prebrané z *Proteins: Structures and Molecular Properties*/ Thomas E. Creighton, 2. vydanie (1993)

Tetraedrálne usporiadanie štyroch rozdielnych skupín na α-uhlíkovom atóme spôsobuje optickú aktivitu aminokyselín. Dva optické obrazy aminokyselín sa nazývajú L-izomér a D-izomér. **Iba L-aminokyseliny sú súčasťou proteínov.** 20 druhov bočných reťazcov, ktoré sa

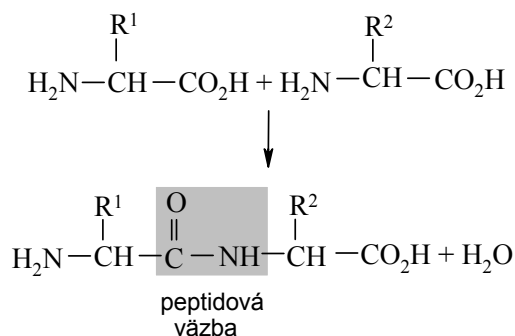
líšia veľkosťou, tvarom, nábojom, chemickou reaktivitou, sa bežne nachádzajú v proteínoch. Všetky proteíny vo všetkých druhoch, od baktérie po človeka, sú konštruované z rovnakého súboru týchto 20 aminokyselín. Táto základná abeceda proteínov je stará viac ako 2 miliardy rokov. Pozoruhodný rozsah funkcií proteínov je výsledkom rozdielných vlastností týchto 20 stavebných blokov (**tabuľka 2.1 a 2.2**).

TABUĽKA 2.2 Vlastnosti jednotlivých aminokyselinových zvyškov *			
Zvyšok	Molekulová hmotnosť (g/mol)	Van der Waalsov objem (Å³)	Frekvencia v proteínoch (%)
Ala (A)	71,09	67	8,3
Arg (R)	156,19	148	5,7
Asn (N)	114,11	96	4,4
Asp (D)	115,09	91	5,3
Cys (C)	103,15	86	1,7
Gln (Q)	128,14	114	4,0
Glu (E)	129,12	109	6,2
Gly (G)	57,05	48	7,2
His (H)	137,14	118	2,2
Ile (I)	113,16	124	5,2
Leu (L)	113,16	124	9,0
Lys (K)	128,17	135	5,7
Met (M)	131,19	124	2,4
Phe (F)	147,18	135	3,9
Pro (P)	97,12	90	5,1
Ser (S)	87,08	73	6,9
Thr (T)	101,11	93	5,8
Trp (W)	186,21	163	1,3
Tyr (Y)	163,18	141	3,2
Val (V)	99,14	105	6,6
Vážený priemer	119,40	161	

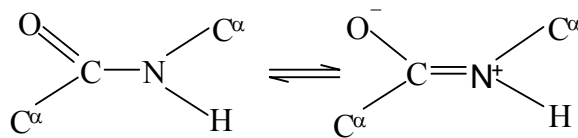
* prebrané z *Proteins: Structures and Molecular Properties*/ Thomas E. Creighton, 2. vydanie (1993)

Peptidová väzba

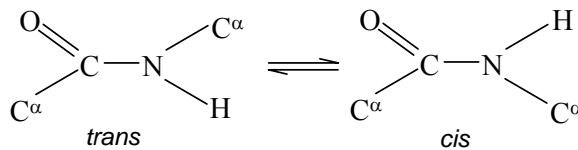
Aminokyseliny sú v proteínoch pospájané **peptidovou väzbou**, vznik ktorej je ilustrovaný na kondenzácii dvoch aminokyselín:



Peptidová väzba má charakter čiastočne dvojitej väzby v dôsledku rezonancie:



Následne, dĺžka peptidovej väzby je iba 1,33 Å, teda je kratšia ako väzba C–N, ktorá má dĺžku 1.45 Å, avšak je dlhšia ako väzba C=N s dĺžkou 1.25 Å. Peptidová väzba má približne 40 % charakter dvojitej väzby. Dôsledkom toho je, že rotácia tejto väzby je obmedzená s veľkou tendenciou nadobúdať planárny charakter. Sú možné dve konfigurácie peptidovej väzby: jedna, pri ktorej sú atómy C α v *trans* a druhá, pri ktorej sú v *cis* polohe:



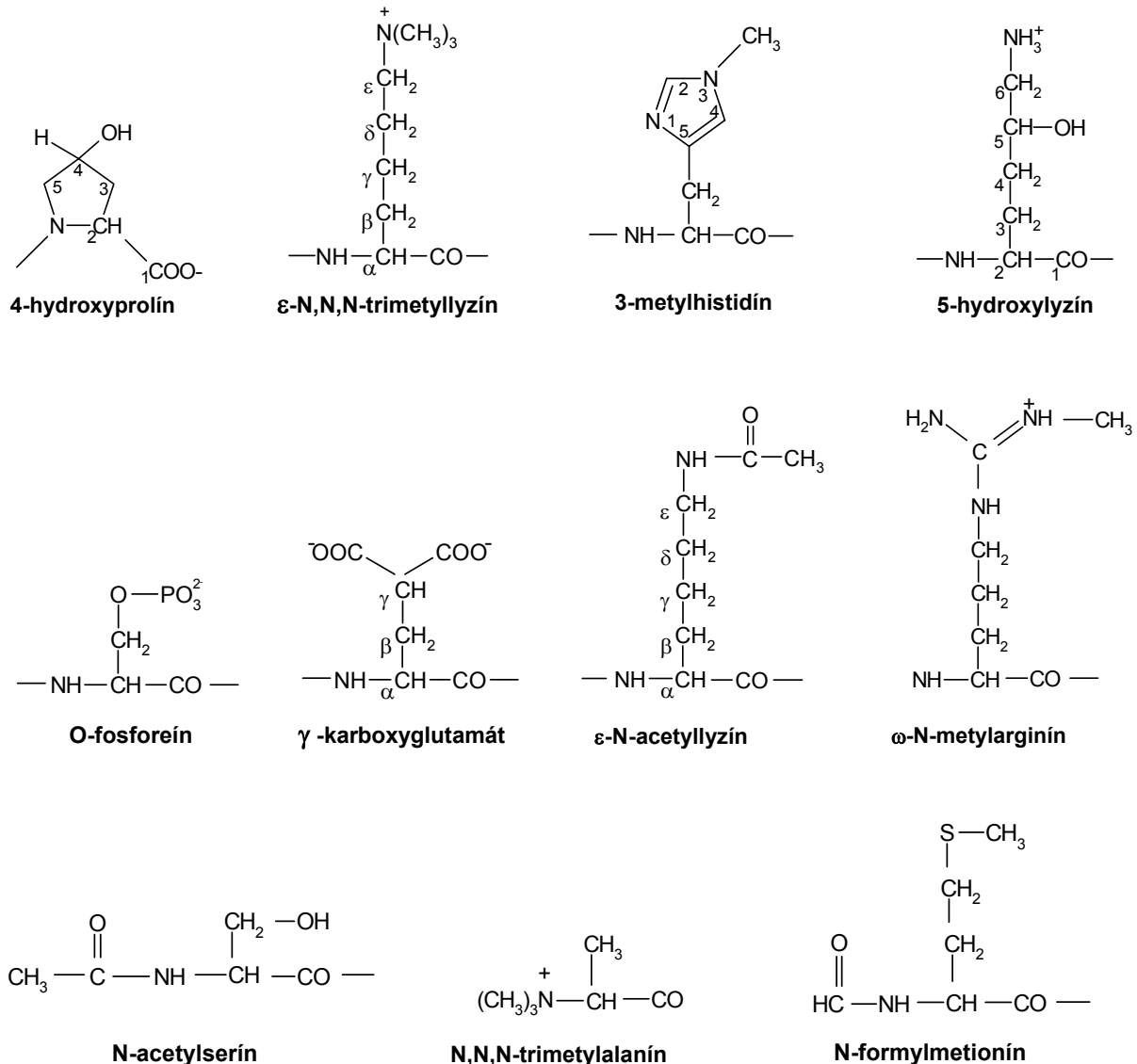
Forma *trans* je energeticky výhodnejšia zo sterických dôvodov.

Aminokyseliny je možné rozdeliť aj podľa reaktivity. Zatiaľ čo nepolárne aminokyseliny ako Gly, Ala, Val, Leu, Ile je ťažké modifikovať, iné ako Asp, Glu, Cys, Lys, Arg dávajú rôzne reakcie typické pre zlúčeniny, ktoré obsahujú karboxylovú, sulfhydrylovú, amino, guanidínovú skupinu. Tieto reakcie sa môžu využívať na relatívne selektívnu modifikáciu aminokyselinových zvyškov v proteíne – predovšetkým cysteinylový zvyšok obsahujúci sulfhydrylovú skupinu sa ľahko alkyluje, čo sa často využíva pri značení proteínov rôznymi "reportérovými" skupinami.

Väčšina aminokyselín, okrem Phe, Tyr, Trp, neabsorbujú nad 250 nm. Optické vlastnosti týchto aminokyselín sa využívajú pri stanovení koncentrácie proteínov (viď strana 27) ako aj pri štúdiu konformačných zmien proteínov. Zmena ich optických vlastností – Millonova, xantoproteínová, Ehrlichova reakcia, resp. modifikácia reaktívnych skupín bočných aminokyselinových zvyškov aromatickými skupinami (Sakaguchiho reakcia) – sa využíva aj pri kvalitatívnom určení prítomnosti týchto aminokyselín v študovaných proteínoch (**úloha 1**).

DERIVÁTY AMINOKYSELÍN V PROTEÍNOCH

Univerzálny genetický kód, ktorý je takmer totožný pre všetky známe formy života, špecifikuje iba 20 základných ("štandardných", kódovaných) aminokyselín. V určitých proteínoch boli nájdené mnohé ďalšie aminokyseliny, z ktorých sú niektoré uvedené na **obrázku 2.1**. **Tieto neobvyklé aminokyseliny, s výnimkou selenocysteínu, vznikli špecifickými modifikáciami aminokyselinových zvyškov v už syntetizovanom polypeptidovom reťazci.** Medzi najznámejšie modifikované aminokyselinové zvyšky patrí **4-hydroxyprolín** a **5-hydroxyprolín**. Oba tieto aminokyselinové zvyšky sú dôležitými štruktúrnymi zložkami vláknitého proteínu **kolagénu**, ktorý je najrozšírenejším proteínom u cicavcov. Často modifikované sú tiež aminokyseliny obsiahnuté v proteínoch, tvoriacich komplexy s nukleovými kyselinami. Napríklad ribozomálne proteíny a chromozomálne proteíny **históny** môžu byť špecificky metylované, acetylované a popri prípade i fosforylované alebo sulfurylované. **N-formylmetionín** je obyčajne začiatočným N-koncovým zvyškom pri syntéze všetkých prokaryotných proteínov, ale väčšinou je neskoršie odstránený počas tzv. maturácie (dozrievania) proteínu. **Kyselina γ -karboxyglutámová** (kyselina 2-amino-4,4-dikarboxymaslová) je obsiahnutá v niekoľkých proteínoch pôsobiacich pri zrážaní krvi.



Obrázok 2.1 Niekoľko menej bežných zvyškov aminokyselín prítomných v proteínoch. Všetky vznikli modifikáciou niektorej z 20 základných aminokyselín v už hotovom polypeptidovom reťazci. Tie zvyšky, ktoré sú pozmenené na α -aminoskupine, sa vyskytujú na N-konci proteínu.

ZVLÁŠTNE ÚLOHY AMINOKYSELÍN

Okrem tvorby proteínov majú aminokyseliny a ich deriváty mnoho biologicky dôležitých funkcií. Niekoľko príkladov je na **obrázku 2.2**. Toto alternatívne použitie aminokyselín je typickým príkladom biologického oportunistu. *Príroda sa snaží prispôbovať už existujúce látky a pochody novým funkciám.*

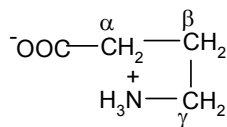
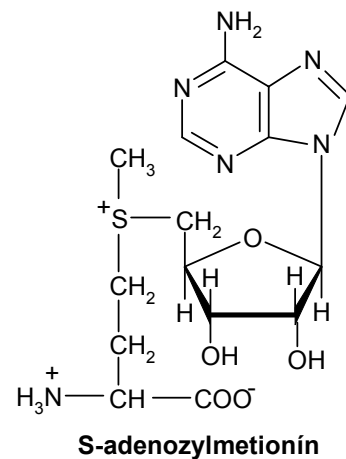
Aminokyseliny a ich deriváty často pôsobia ako chemickí poslovci v komunikácii medzi bunkami. Napríklad **glycín**, **γ -aminomaslová kyselina (GABA)**, produkt dekarboxylácie glutamátu) a **dopamín** (odvodený od tyrozínu) sú nervové mediátory, teda látky uvoľňované nervovou bunkou k ovplyvneniu správania sa susedných buniek. **Histamín** (produkt dekarbo-

xylácie histidínu) je sprostredkovateľom v alergických reakciách a **tyroxín** (derivát tyrozínu) je hormónom štítnej žľazy, obsahuje jód a všeobecne stimuluje metabolizmus stavovcov.

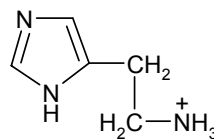
Niektoré aminokyseliny sú dôležitými medziproduktami rôznych metabolických pochodov. Patria k nim medziprodukty biosyntézy močoviny **citrulín** a **ornitín**, ďalej **homocystein**, vyskytujúci sa v metabolizme aminokyselín a **S-adenozylmetionín**, podieľajúci sa na metylačných reakciách.

Rozmanitosť prírody je naozaj pozoruhodná. Dodnes bolo objavených v rozličných rastlinách a hubách asi 250 rôznych aminokyselín. Biologický význam väčšiny z nich je záhadný, aj keď zistená toxicita mnohých svedčí o ich úlohe pri ochrane organizmu. Mnohé z týchto aminokyselín sú jednoduchými derivátmi základných 20 aminokyselín, ale napr. **azaserín** (používaný ako antibiotikum) či **β-kyanoalanín** majú neobvyklú štruktúru.

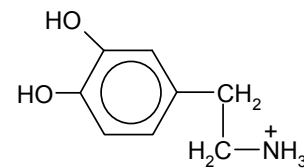
Napriek tomu, že sa v proteínoch vyskytujú len L-aminokyseliny, boli v mnohých organizmoch objavené i D-aminokyseliny. Tie sú priamo syntetizované a často sa podieľajú na stavbe bunkových stien baktérií. Možno je to tiež súčasťou ochrany bunky, pretože vďaka D-aminokyselinám je bunková stena menej ohrozená útokom **peptidáz** (enzýmami hydrolyzujúcimi peptidové väzby), ktoré rôzne organizmy používajú k natráveniu bunkových stien baktérií. D-aminokyseliny sú tiež súčasťou mnohých antibiotík, ako **valinomycínu**, **aktinomycínu D** a **gramicidínu S**.



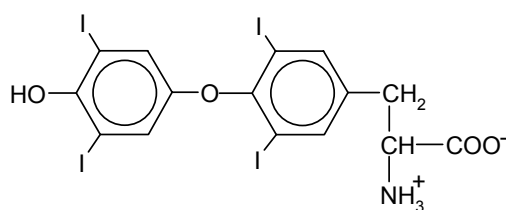
kyselina γ -aminomaslová
(GABA)



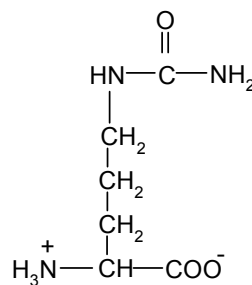
histamín



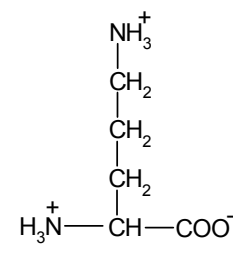
dopamín



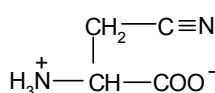
tyroxín



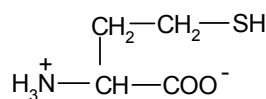
citrulín



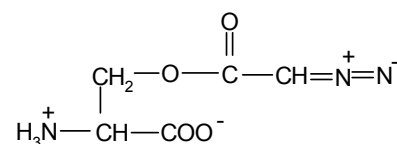
ornitín



β -kyanoalanín



homocystein



azaserín

Obrázok 2.2 Niekoľko prirodzených derivátov základných aminokyselín a niekoľko aminokyselín, ktoré sa nevyskytujú v proteínoch.

IZOLÁCIA PROTEÍNOV

Na charakterizáciu proteínov z biochemického a biofyzikálneho hľadiska je potrebné relatívne veľké množstvo týchto biomakromolekúl – rádovo 1-10 mg.

Tieto sa získavajú izoláciou buď priamo z tkanív, kde sa nachádzajú vo väčšom množstve – týka sa to predovšetkým eukaryotických proteínov, napr. proteíny dýchacieho reťazca sa izolujú zo srdca koňa. V prípade prokaryotických proteínov sa využívajú techniky rekombinantnej DNA – vloženie génu pre daný proteín do vhodného organizmu je možné efektívne získať relatívne veľké množstvá, často krát problematicky dostupného proteínu. Ako príklad je možné uviesť proteíny z termofilných organizmov, ktoré sa s úspechom získavajú pomocou nadprodukcie z mezofilného prokaryota *Escherichia coli* (*E. coli*).

Základný postup pri izolácii proteínov je nasledujúci:

1. Uvoľnenie proteínov z bunky

Narušenie buniek tkanív sa uskutočňuje predovšetkým mechanickou cestou pomocou homogenizátorov.

U prokaryotov sa oslabuje bunková stena natrávením polysacharidov spevňujúcich bunkovú stenu pomocou lyzozýmu. Na skvapalenie viskózneho roztoku, ktorý je spôsobený polysacharidmi a deoxyribonukleovými kyselinami, sa pridáva DNáza I. V tejto fáze sa pridávajú do roztoku aj inhibítory proteáz, ktoré by po uvoľnení z bunky mohli naštiepiť izolovaný proteín. Rozrušenie membrány sa uskutočňuje metódou zmrazovania a rozmrazovania (*freeze and thaw*), ktorej podstatou je, že vznikajúce kryštáliky roztoku počas fázy zmrazovania mechanicky narušujú bunkovú stenu. Inou metódou je inkubácia bunkovej pasty v tlakovej fľaši (30-60 min) pod tlakom 150 atmosfér. Následné vytlačenie tejto suspenzie cez úzky otvor spôsobí v dôsledku strižných síl, pôsobiacich na bunkovú stenu, jej narušenie.

Zvyšky membrán a nerozpustné častice sa odstránia centrifugáciou. Proteín, ktorý nás zaujíma, sa nachádza väčšinou v supernatante. Supernatant – kvapalná časť v centrifugačnej skúmavke sa odloží pre ďalšie spracovanie a pellet – tuhá časť nachádzajúca sa na dne centrifugačnej skúmavky – sa vyhodí.

2. Ďalší postup v izolácii závisí od vlastností izolovaného proteínu. Najbežnejšie metódy sa zakladajú na princípe:

- a) rozličnej rozpustnosti proteínových zložiek zmesi,
- b) rôznej stability proteínov,
- c) interakcie proteínov so špecifickými zrážacími činidlami,
- d) použitia špecifických adsorbentov.

Týmito metódami sa väčšinou nezíska homogénna proteínová frakcia, ale sú iba hrubým spôsobom rozdelenia základnej zmesi.

2a Delenie proteínov na základe ich rozličnej rozpustnosti

Rozpustnosť proteínov ovplyvňujú štyri základné faktory. Je to **prítomnosť solí, organických rozpúšťadiel, pH a teplota**. Všetky tieto faktory sa môžu využiť pri delení proteínov na základe ich rozpustnosti.

Rozpustnosť globulárnych proteínov závisí od **iónovej sily roztoku**. Na základe minimálnej koncentrácie rôznych neutrálnych solí potrebných na precipitáciu daného proteínu, boli anióny a katióny usporiadané do tzv. **Hofmeisterovej série** (Hofmeister, F., 1888, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *II. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **24**, 247-260).

HOFMEISTEROVA SÉRIA

kozmotropné (vysol'ovanie)

chaotropné (vsoľovanie)

anióny: $F^- > PO_4^{3-} > SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > Br^- > I^- > SCN^- > ClO_4^-$

katióny: $(CH_3)_4N^+ > (CH_3)_2N_2^+ > NH_4^+, K^+, Na^+, Cs^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+}$

Obrázok 2.3 Usporiadanie iónov podľa ich schopnosti vysol'ovať proteíny. *Poznámka:* Uvedená Hofmeisterova séria nie je absolútna – efektívnosť (poradie v Hofmeisterovej sérii) jednotlivých solí ovplyvňovať rozpustnosť a iné vlastnosti proteínov sa môžu prípad od prípadu mierne odlišovať.

Len málo proteínov je rozpustných v destilovanej vode, nízka koncentrácia elektrolytu zvyšuje ich rozpustnosť. Zvýšenie rozpustnosti pridaním nízkej koncentrácie soli sa nazýva **vsoľovanie** (*salting-in effect*). Efekt vsoľovania možno využiť pri delení proteínov tak, že sa zmes proteínov postupne extrahuje roztokmi s narastajúcou koncentráciou soli, prípadne sa roztok proteínov podrobí dialýze a precipitát (zrazenina) sa oddelí odstredení (scentrifugovaním). Takto možno deliť napr. albumíny od globulínov (**úloha 5**).

Pri delení proteínov zmenou koncentrácie elektrolytu sa v oveľa väčšej miere uplatňuje **vysol'ovanie** (*salting-out effect*), pri ktorom sa používa vysoká koncentrácia soli. Najvyšší vysol'ovací efekt majú multivalentné ióny, predovšetkým fosfát a sulfát (síran). Sulfát sa najčastejšie používa vo forme amónnej alebo sodnej soli. Soľ sa môže pridávať ako nasýtený roztok, alebo ako tuhá substancia. Postupným zvyšovaním koncentrácie soli a následným odstredení vyzrážanej frakcie možno rozdeliť zmes na niekoľko frakcií. Pri vysol'ovaní však treba dodržiavať dve zásady :

1. Soľ sa musí pridávať pomaly, bez vzniku vysokej lokálnej koncentrácie soli, pri ktorej sa predčasne vyzráža časť niektorej frakcie.
2. Po pridaní celého množstva soli treba zmes ešte 15 až 30 minút premiešavať, čím sa dosiahne kompletná precipitácia.

Frakcionácia proteínov vysol'ovaním má veľkú výhodu v tom, že sa môže použiť neobmedzený objem vzorky.

Proteíny sa dajú z roztoku vyzrážať **organickými rozpúšťadlami**, ktoré sa miešajú s vodou, napr. acetón a etanol. Pri tomto spôsobe zrážania proteínov vzniká nebezpečenstvo ich denaturácie, preto sa obyčajne pracuje pri nízkych teplotách. Zmenou koncentrácie organického rozpúšťadla v roztoku od 0 do 80 % možno získať niekoľko proteínových frakcií. Príkladom použitia etanolu na takúto frakcionáciu je delenie plazmatických proteínov alkoholovou frakcionáciou. Acetón sa používa napr. pri delení proteínov kostrového svalu, amy lázy a pod.

Rozpustnosť proteínov ovplyvňuje aj **pH prostredia**. Vyplýva to z amfóternej štruktúry proteínov. Celkový náboj ich molekuly je súčet nábojov jednotlivých nabitých skupín. Pri určitom pH sa dosiahne taká disociácia polárnych skupín, že **celkový náboj molekuly je nulový (izoelektrický bod)**. Rozpustnosť proteínu v izoelektrickom bode je nízka, a preto ľahko precipituje. Len málo proteínov sa vyzráža z roztoku v izoelektrickom bode bez akéhokoľvek vedľajšieho zásahu, napr. kazeín z mlieka pri pH 4,5. Treba použiť ešte nejaký iný zrážací faktor, napr. neutrálne soli, organické rozpúšťadlo a pod. Pri delení proteínov zrážaním v izoelektrickom bode treba brať do úvahy aj to, že niektoré proteíny v izoelektrickom bode ľahko podliehajú denaturácii.

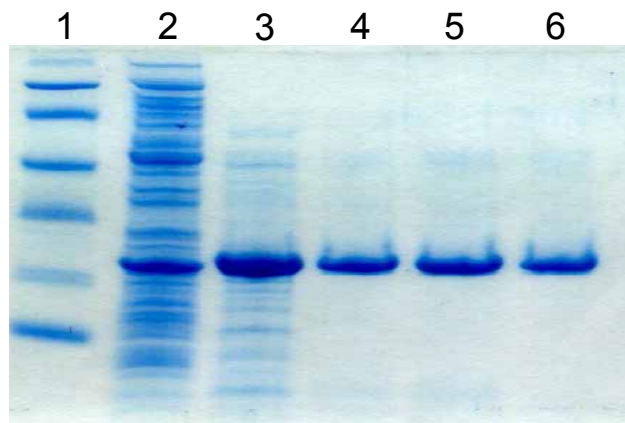
2b Delenie proteínov na základe ich rozličnej stability

Proteíny sa líšia v citlivosti na tepelnú denaturáciu. Niektoré z nich sa rýchlo denaturujú už pri laboratórnej teplote, iné zasa vydržia aj krátky var. Táto vlastnosť sa môže využiť pri frakcionácii, keď je izolovaný proteín tepelne stabilný. Zahriatím roztoku delenej zmesi sa kontaminujúce proteíny denaturujú a môžu sa oddeliť. Delenie sa často robí v prítomnosti stabilizátora, ktorý zvyšuje stabilitu izolovaného proteínu. Príkladom je izolácia α -amylázy, kedy sa ako stabilizátor používajú ióny vápnika, pričom proteázy a β -amyláza sa teplom denaturujú.

Iným príkladom je izolácia elongačného faktora Ts z *Thermus thermophilus* (fyziologická teplota 70-75 °C) po jeho nadprodukcii v *Escherichia coli* (fyziologická teplota 37 °C).

Pri frakcionácii proteínov tepelnou denaturáciou treba rátať s tým, že denaturované proteíny môžu po vychladnutí renaturovať (späť sa zbaľovať), preto treba koagulát čo najrýchlejšie oddeliť. Ďalej pri zahrievaní je čas vyhriatia roztoku rozdielny podľa toho, či sa pracuje s malým, alebo veľkým objemom. Keďže stupeň denaturácie závisí aj od času zahrievania, je vhodné pracovať so štandardným objemom vzorky.

Druhý spôsob diferenciálnej inaktivácie je spracovanie zmesi proteínov v extrémnych podmienkach pH, v ktorých nastáva selektívna denaturácia kontaminujúcich proteínov. Izolovaný



Obrázok 2.4 Kontrola čistoty proteínu po jednotlivých krokoch pri izolácii EF-Ts z *T. thermophilus* nadprodukovaného v *E. coli* pomocou SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Stĺpec:

- 1 – štandardy s danou molekulovou hmotnosťou,
- 2 – supernatant po rozbití buniek a scentrifugovaní nerozpustných častí,
- 3 – po zahriatí supernatantu na 70 °C počas 10 min (všimnite si výrazný úbytok pásov, zodpovedajúci úbytku "znečisťujúcich" proteínov),
- 4 – po anión-výmennej chromatografii,
- 5 – po kation-výmennej chromatografii,
- 6 – koncový produkt – čistý proteín.

proteín však musí byť v týchto podmienkach stála. Príkladom je izolácia ribonukleázy z pankreasu roztokom H_2SO_4 s koncentráciou $0,12 \text{ mol/dm}^3$, kedy sa podstatná časť sprievodných proteínov denaturuje.

2c Delenie proteínov interakciou so špecifickými proteínovými zrážadlami

Veľa proteínov sa vyvráža **solami ťažkých kovov**. Vyvrážený proteín môže zostať aktívny, alebo sa môže denaturovať, čo sa využíva pri ich delení. Ak sa proteín, ktorý sa má izolovať takouto soľou zráža a nedenaturuje sa, postupuje sa tak, že sa proteín zo zmesi po vyvrážení oddelí a soľ ťažkého kovu sa odstráni dialýzou, chelátovým činidlom, prípadne ionexom. V prípade, že sa izolovaný proteín soľou ťažkého kovu nezráža, môže sa takto oddeliť časť balastových (nechcených) proteínov, vyvrážených použitou soľou. Tento spôsob frakcionácie je dosť obmedzený pre enzýmy, pretože soli ťažkých kovov sú vo všeobecnosti inhibítormi enzýmov.

Zmes proteínov sa môže frakcionovať aj niektorými kyselinami, napr. kyselinou trichlóroctovou, sulfosalicylovou a pod. Niektoré proteíny, napr. glykoproteíny účinkom týchto kyselín precipitujú ťažko, čím sa môžu oddeliť od vyzrážaných proteínov.

2d Delenie proteínov adsorpčnou chromatografiou

Proteíny sa dajú deliť aj na povrchoch niektorých tuhých látok, ktoré sú schopné **reverzibilne viazať** určité molekuly proteínov. Medzi takéto adsorbenty patria hydratovaný oxid hlinitý, kalciumfosfátový gél (hydroxyapatit), aktívne uhlie, kremičitý gél, niektoré zeminy a pod. Z nich najčastejšie používaným je hydroxyapatit. Delenie sa robí tak, že sa adsorbent mieša s roztokom proteínov, čím dochádza k ich adsorbácii. Keď sa na adsorbent viaže proteín, ktorý sa má pripraviť v čistom stave, adsorbent sa odstredí a naviazaný proteín sa vytesní vhodným tlmivým roztokom. Ak sa na adsorbent viažu iba balastové proteíny, po odstredení adsorbentu zostáva proteín v roztoku.

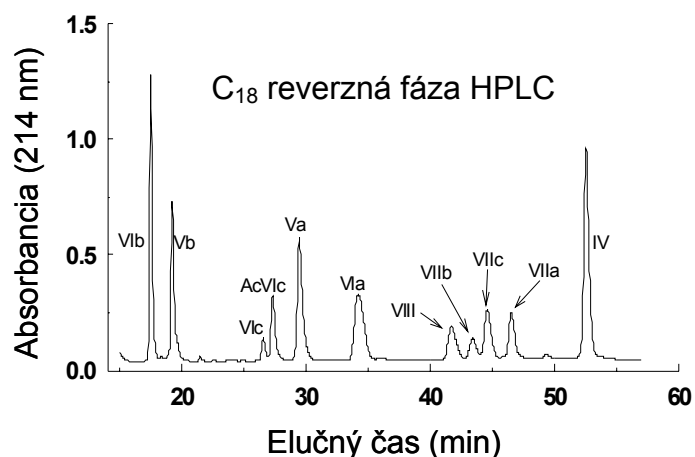
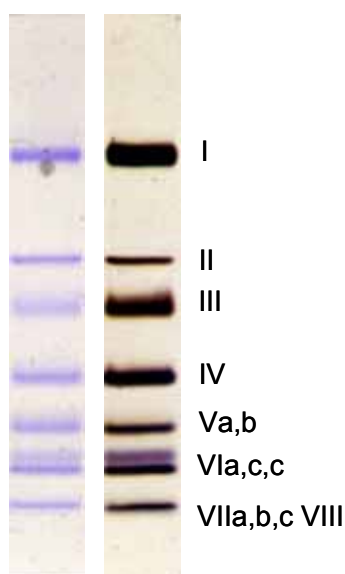
Adsorpciu proteínov ovplyvňujú viaceré faktory, napr. pH, iónova sila, teplota a pod. Preto pri použití tejto deliacej metódy sa musia empiricky zistiť vhodné podmienky pre jednotlivé použité adsorbenty a delené proteíny. Platí to aj pre desorpciu proteínu z adsorbentu. Pri desorpcii sa najčastejšie používa zmena pH a iónovej sily roztoku.

Ďalšie metódy delenia proteínov

Modernejšie/jemnejšie metódy používané pri izolácii čistých proteínov, využívajú viaceré fyzikálnochemické a biologické vlastnosti týchto makromolekúl. Patria sem **chromatografické** a **elektroforetické** metódy. **Chromatografické metódy** využívajú rozdielny náboj proteínových molekúl (ionexová chromatografia), rôznu veľkosť molekúl (gélová filtračná chromatografia), rozdielne izoelektrické body (chromatofokusácia), schopnosť špecificky reagovať s niektorými látkami (afinitná chromatografia), rozličnú rozpustnosť (upravená rozdeľovacia chromatografia), ako aj rozličné množstvo nepolárnych hydrofóbných skupín (hydrofóbná chromatografia).

Elektroforetické metódy využívajú rozdielny elektrický náboj molekúl proteínov na ich rozdelenie v elektrickom poli. Napríklad elektroforéza na nosičoch, izoelektrická fokusácia, izotachoforéza a metódy, ktoré kombinujú chromatografické a elektroforetické delenia.

SDS PAGE



Obrázok 2.5 (*predchádzajúca strana*) Ukážka/porovnanie dvoch metód pri analýze zloženia 13-subjednotkového (I, II, III, IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, VIII) membránového proteínu *cytochróm c oxidázy* z hovädzích srdc (Prof. Neal C. Robinson, The University of Texas Health Science Center at San Antonio).

Vľavo: SDS-PAGE – ukážka „zviditeľnenia“ proteínov pomocou farbičky *Coomassie Brilliant Blue* (modré pružky) a pomocou farbenia striebrom (hnedé pružky).

Výhoda – v princípe možnosť detekcie všetkých subjednotiek.

Nevýhoda – prekrývajúce sa pásy; prácna, u niektorých subjednotiek prakticky nemožná kvantitatívna analýza.

Vpravo: chromatografické delenie (*reversed phase HPLC*).

Výhoda – rýchla a kvantitatívna analýza subjednotiek.

Nevýhoda – neschopnosť analyzovať niektoré subjednotky (v danom prípade subjednotky I až III).

METÓDY URČOVANIA MNOŽSTVA (KONCENTRÁCIE) PROTEÍNOV

Je užitočné, často však nie nevyhnutné, určiť celkové množstvo proteínov v každom stupni izolácie proteínu. V praxi je zvyčajne dôležitejšia biologická alebo biochemická aktivita frakcií. Avšak, za istých okolností je nevyhnutné poznať obsah proteínu, napríklad, pri určení stupňa čistoty daného proteínu po určitom kroku jeho izolácie, alebo pri určení špecifickej koncentrácie finálneho produktu. Navyše, isté kroky izolácie sú veľmi citlivé na koncentrácie proteínu.

Počas mnohých rokov štúdiá proteínov boli popísané viaceré metódy na určovanie množstva proteínov. Zo starších metód je najvýznamnejšia metóda určenia dusíka pomocou Kjeldahlovej metódy. K novším metódam patria infračervená spektroskopia, turbidimetria, fluorimetria, refraktometria a polarografia. Ak je známa primárna sekvencia študovaného proteínu, tak z analýzy aminokyselinového zloženia je možné získať presné kvantitatívne údaje. Treba však mať na pamäti, že niektoré aminokyseliny, špeciálne Trp, Cys a cystín (Cys–Cys), sú zvlášť citlivé na kyslú hydrolýzu, čo je dôležité brať do úvahy pri spracovaní údajov. Navyše, Gln a Asn sa pri kyslej hydrolýze menia na zodpovedajúce kyseliny Glu a Asp. V praxi však často krát, predovšetkým v prípade prvýkrát izolovaných proteínov, nie je známa primárna sekvencia aminokyselín izolovaného proteínu.

Najbežnejšie súčasné metódy na určovanie koncentrácie proteínov sú založené na ich absorpcii žiarenia v UV oblasti alebo vo viditeľnej oblasti spektra po chemickej reakcii za vzniku chromofórov (**úloha 3 a 8**).

Je dôležité si zapamätať, že všetky tieto metódy sú semikvantitatívne ak nie sú štandardizované na proteín, ktorého koncentráciu určujeme. Je taktiež dôležité si uvedomiť, že reakcia proteínu na prítomnú farbičku závisí od aminokyselinového zloženia proteínu a môže byť ovplyvnená prítomnosťou neproteínovej prostetickej skupiny, napr. sacharidovej zložky. Preto, takmer univerzálne použitie hovädzieho sérového albumínu (*BSA - bovine serum albumin*) ako štandardného proteínu nie je úplne uspokojujúce a je žiaduce, kde je to možné, kalibrovať danú metódu používajúc proteín, ktorého koncentráciu určujeme.

UV spektrofotometria

Meranie v ďalekej UV oblasti

Peptidová väzba v proteínoch a peptidoch má dobre definované absorpčné maximum pri 191-194 nm. Táto metóda je dostatočne citlivá – vyžaduje cca 0,01-0,05 mg proteínu a relatívne nezávislá na aminokyselinovom zložení proteínu. Problém je, že v tejto oblasti

vlnových dĺžok absorbuje už aj kyslík, preto sa používa vlnová dĺžka 205 nm. **Absorbancia proteínového roztoku s koncentráciou 1 mg/ml pri 205 nm je okolo 30.** Isté odchýlky od tejto hodnoty spôsobuje Tyr a Trp, preto je nutné urobiť korekciu extinkčného koeficientu (mólového absorpčného koeficientu, ϵ) na prítomnosť Tyr a Trp v proteíne podľa vzťahu:

$$\epsilon_{205}^{1\text{mg/ml}} = 27,0 + 120 \cdot A_{280}/A_{205}$$

Pri tejto metóde je nevyhnutné používať kremenné (*quartz*) kvety a tlmivé roztoky s minimálnou absorbanciou pri tejto vlnovej dĺžke (pozri <http://kosice.upjs.sk/~kbch/document.php?name=labsamples&lang=sk>).

Meranie pri 280 nm

Väčšina proteínov absorbuje pri 280 nm v dôsledku prítomnosti fenolovej skupiny Tyr a indolovej skupiny Trp. Extinkčný koeficient sa zvyčajne vyjadruje v tvare $\epsilon_{280}^{1\%}$ ($\epsilon_{280}^{10\text{mg/ml}}$), príp. $\epsilon_{280}^{1\text{mg/ml}}$ ($\epsilon_{280}^{0,1\%}$) a predstavuje špecifický absorpčný koeficient. Inými slovami, ide o **absorbanciu jednopercentného roztoku v jednocentimetrovej kvete** pri danej vlnovej dĺžke (v tomto prípade 280 nm).

Hodnoty $\epsilon_{280}^{1\text{mg/ml}}$ ležia pre väčšinu proteínov v rozmedzí 0,4-1,5, ale napríklad pre parvalbumín a Ca^{2+} -príbuzné proteíny $\epsilon_{280}^{1\text{mg/ml}} = 0,0$ a lyzozým 2,65. Metóda je dosť nepresná, ak proteín nie je v relatívne čistej forme a ak samotná metóda nie je kalibrovaná na tento proteín. Táto metóda je relatívne necitlivá a na zmysluplné určenie absorbancie vyžaduje 0,05 až 2 mg proteínu. Je však veľmi citlivá na komponenty, ktoré absorbujú pri 280 nm, špeciálne na látky obsahujúce purínový alebo pyrimidínový kruh (nukleové kyseliny, nukleozidy). V takom prípade je potrebné absorbanciu pri 280 nm korigovať podľa nasledujúcej rovnice:

$$\text{proteín(mg/ml)} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$$

Ak samotný roztok bez proteínu absorbuje žiarenie s vlnovou dĺžkou 280 nm, je potrebné odčítať hodnotu absorbancie tohto roztoku od absorbancie vzorky obsahujúcej meraný proteín. Vo všeobecnosti roztok bez analyzovanej látky (v tomto prípade bez proteínu) nazývame porovnávací roztok, príp. *blank* (z angl. prázdny). Zvykom je tiež používať výrazy referencia alebo pozadie.

Veľká výhoda tejto metódy je jej rýchlosť a to, že je nedeštruktívna, teda meraná vzorka môže byť využitá na ďalšie experimenty. Pri tejto metóde je taktiež nevyhnutné používať kremenné kvety.

Edelhochova metóda

Je oveľa presnejšia ako predchádzajúce, avšak je potrebné poznať množstvo Tyr, Trp a cystínov v proteíne. Metóda je založená na tom, že neznámy parameter, teda blízke okolie Tyr a Trp v natívnom proteíne, ktoré ovplyvňuje extinkčné koeficienty týchto chromofórov sú "normalizované" na jednotné prostredie – 6 M guanidinium HCl (GdmHCl), v ktorom sú proteíny rozbalené a tyrozinylové a tryptofanylové zvyšky sú vystavené solventu.

Postup určenia množstva proteínu spočíva v nasledujúcich krokoch:

(i) určí sa teoretický extinkčný koeficient proteínu v 6 M guanidín HCl pri 280 nm na základe známeho počtu #Tyr, #Trp a #cystínov v proteíne a extinkčných koeficientov $\epsilon_{280}(\text{Tyr})$, $\epsilon_{280}(\text{Trp})$ a $\epsilon_{280}(\text{cystínov})$ v 6 M GdmHCl, ktoré sú $1\,285\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $5\,685\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a $125\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, podľa vzťahu:

$$\epsilon_{280\text{ v }6\text{ M GdmHCl}} (\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}) = 5\,685 \cdot \#\text{Trp} + 1\,285 \cdot \#\text{Tyr} + 125 \cdot \#\text{cystín}$$

- (ii) určí sa absorpcia proteínu pri 280 nm v 6 M GdmHCl, A_{280} v 6 M GdmHCl,
 (iii) koncentrácia proteínu c sa určí z pomeru:

$$c_{280 \text{ v } 6 \text{ M GdmHCl}} = A_{280 \text{ v } 6 \text{ M GdmHCl}} / \epsilon_{280 \text{ v } 6 \text{ M GdmHCl}}$$

(iv) následne môžeme určiť extinkčný koeficient pre natívny proteín $\epsilon_{280 \text{ v pufrí}}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) tak, že určíme absorpciu $A_{280 \text{ v pufrí}}$ pre to isté množstvo proteínu v rovnakom objeme tlmivého roztoku ako bol v bode (ii) použitý pri meraní extinkčného koeficientu v 6 M GdmHCl podľa vzťahu:

$$\epsilon_{280 \text{ v pufrí}} = A_{280 \text{ v pufrí}} / c_{280 \text{ v } 6 \text{ M GdmHCl}}$$

Pre presné meranie je dôležité merať absorpčné spektrum v pufrí a v 6 M GdmHCl nie iba pri 280 nm, ale minimálne v oblasti 250 až 350 nm, aby sme odhalili prípadnú agregáciu, ktorá sa prejavuje rozptylom svetla a zvyšuje zdanlivú absorpciu v oblasti 280 nm. Ak sa v týchto roztokoch pozoruje absorbancia nad ~ 325 nm, potom absorbancia určená pri 280 nm musí byť korigovaná na rozptyl svetla niektorým z nasledujúcich spôsobov:

- (i) $A_{280 \text{ nm korigovaná}} = A_{280 \text{ nm nameraná}} - 1,929 \cdot A_{330 \text{ nm nameraná}}$
 (ii) $A_{280 \text{ nm korigovaná}} = A_{280 \text{ nm nameraná}} - 2,0 \cdot A_{333 \text{ nm nameraná}}$

Metóda podľa Pace a kol.

Na základe vzorky 116 extinkčných koeficientov nameraných pre 80 proteínov vo vode bol určený empirický vzťah na určenie extinkčného koeficientu natívneho proteínu pri 280 nm iba na základe počtu #Tyr, #Trp a #cystínov v proteíne:

$$\epsilon_{280} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = 5\,500 \cdot \text{\#Trp} + 1\,490 \cdot \text{\#Tyr} + 125 \cdot \text{\#cystín}$$

Takto určený ϵ_{280} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) je spoľahlivý pre proteíny, ktoré obsahujú Trp zvyšky a menej spoľahlivý pre tie proteíny, ktoré tryptofány neobsahujú.

(Pace N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. & Gray T., 1995, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-2423).

Biuretova metóda

V alkalickom prostredí sa meďnatý kation viaže na dusík peptidov a proteínov za vzniku komplexu s absorpčným maximom pri 540-560 nm. Nedochádza k interferencii s voľnými aminokyselinami a existuje iba malá závislosť na primárnej štruktúre proteínu, keďže meď reaguje s peptidovým reťazcom a nie s bočnými skupinami. Odporúčaný postup je uvedený v **tabuľke 2.3**.

TABUĽKA 2.3 Biuretova metóda

1. Pripravíme Biuretovo činidlo tak, že rozpustíme 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 6 g vianu sodno-draselného v 500 ml vody. Pridáme 10 % w/v hydroxidu sodného a doplníme vodou do 1 litra.
 2. Uskladníme činidlo v plastovej fľaši na tmavom mieste. Činidlo vydrží veľmi dlho ($t \rightarrow \infty$) ak k nemu pridáme 1 g jodidu draselného, ktorý zabráni redukcii meďnatých iónov.
 3. K vzorke s objemom 0,5 ml, ktorá obsahuje až do 3 mg proteínu, pridáme 2,5 ml Biuretovoho činidla.
 4. Necháme stáť 30 minút.
 5. Meriame absorbanciu pri 540 nm. Porovnávací roztok obsahuje 0,5 ml tlmivého roztoku a 2,5 ml Biuretovoho činidla.
-

Najväčšou nevýhodou tejto metódy, ktorá výrazne obmedzuje jej použiteľnosť je **nízka citlivosť** (1-6 mg proteínu/ml). Citlivosť metódy môže byť zvýšená: **(i)** separáciou komplexu med'-proteín gélovou filtráciou s následným uvoľnením medi z komplexu a jej kolorimetrickým určením, **(ii)** meraním absorbancie štandardnej Biuretovej reakcie v blízkej UV oblasti pri 310 nm. Niektoré tlmivé roztoky predovšetkým tie na báze Tris-u môžu interferovať s Biuretovou reakciou, ako aj tie, ktoré obsahujú amóniový kation, čo značne komplikuje meranie frakcií získaných po precipitácii sulfátom amónnym.

Lowryho metóda

Patrí k najbežnejšie používaným metódam na stanovenie koncentrácie proteínu. Základom metódy je Biuretova reakcia proteínu s med'ou v alkalickom prostredí a redukcia Folin-Ciocalteu fosfomolybdenofosfowolfrámovej kyseliny na heteropolymolybdénovú modrú, v dôsledku med'ou katalyzovanej oxidácie aromatickým aminokyselinových zvyškov. Reakcia má za následok vznik intenzívnej modrej farby a je citlivejšia (0,1-1 mg proteínu/ml) v porovnaní s Biuretovou metódou. Odporúčaný postup je uvedený v **tabuľke 2.4**.

TABUĽKA 2.4 Lowryho metóda

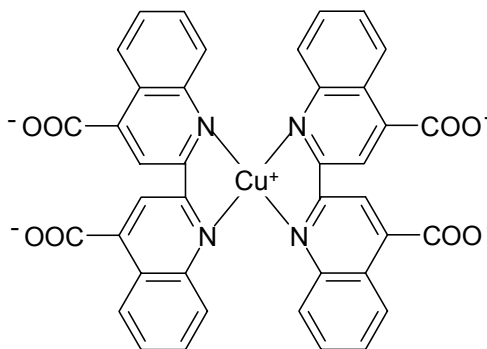
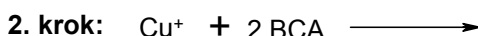
1. Zásobné roztoky činidiel: **A**, 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; **B**, 2 % w/v vínan sodno-draselný; **C**, 0,2 M hydroxid sodný; **D**, 4 % w/v uhličitan sodný. Tieto činidlá sú stabilné pri izbovej teplote.
 2. Do 49 ml činidla C pridaj 49 ml činidla D. Potom pridaj 1 ml činidla A a následne 1 ml činidla B. Tento med'nato-alkalický roztok (činidlo **E**) musí byť pripravované vždy čerstvé.
 3. Do 10 ml Folin-Ciocalteu činidla pridaj 10 ml vody. Toto je činidlo **F**.
 4. Do 0,5 ml vzorky obsahujúcej až do 0,5 mg proteínu pridaj 2,5 ml činidla E.
 5. Zmiešaj a nechaj reagovať 10 minút.
 6. Pridaj 0,25 ml činidla F.
 7. Zmiešaj a nechaj reagovať 30 minút.
 8. Zmeraj absorbanciu pri 750 nm. Porovnávací roztok obsahuje 0,5 ml tlmivého roztoku opracovaného podľa bodov 4 až 7.
-

Treba poznamenať, že reakcia je veľmi citlivá na pH prostredia – je preto potrebné udržať pH v rozmedzí 10,0-10,5. V dôsledku variability zásobného roztoku Folin-Ciocalteu činidla je dôležité pre každý zásobný roztok nájsť vhodné riedenie na dosiahnutie finálneho pH. Navyše, na dosiahnutie reprodukovateľných výsledkov je dôležité dodržiavať jednotlivé časové intervaly pridávania a zmiešavania jednotlivých činidiel.

Reakcia iba mierne závisí na aminokyselinovom zložení proteínu. Na druhej strane však s danou reakciou môže interferovať viacero látok. K týmto zlúčeninám patria amino deriváty, aminokyseliny, tlmivé roztoky, detergenty, lipidy, sacharidy, nukleové kyseliny, soli a sulfhydrylové zlúčeniny (existujú zoznamy testovaných látok a ich množstvá tolerovateľné pre použitie tejto metódy). Špeciálnym problémom je prítomnosť detergentov (aniónových, zwitterionových a neiónových) kvôli ich častému použitiu pri rozpúšťaní proteínov. Pre roztoky, ktoré obsahujú detergenty sú vyvinuté rôzne variácie Lowryho metódy. Ďalším často prehliadaným problémom tejto metódy je nelinearita kalibračnej krivky.

BCA (bicinchoninic acid) metóda

Množstvo problémov spojených s Lowryho metódou spočíva vo vlastnostiach detekčného činidla (Folin-Ciocalteu). Preto bola vyvinutá metóda založená na alternatívnom detekčnom činidle, kyselíne bicinchonínovej (BCA). Princíp metódy:



BCA-Cu⁺ komplex

Reakcia dáva intenzívne fialové sfarbenie s maximom absorpcie pri 562 nm. Citlivosť BCA metódy (0,1-1,2 mg proteínu/ml) je podobná ako v prípade Lowryho metódy. Odporúčaný postup je uvedený v **tabuľke 2.5A**. Bola taktiež vyvinutá presnejšia metóda, tzv. *BCA microassay* metóda (0,5-10 µg proteínu/ml), ktorej postup je uvedený v **tabuľke 2.5B**.

TABUĽKA 2.5A BCA metóda

1. Zásobné roztoky činidiel: **A**, 1 % w/v BCA-Na₂, 2 % w/v Na₂CO₃, 0,16 % w/v vínan sodný, 0,4 % w/v NaOH a 0,95 % NaHCO₃. Ak je potrebné, 50 % w/v NaOH alebo pevný NaHCO₃ na úpravu pH na hodnotu 11,25. **B**, 4 % w/v CuSO₄·5H₂O. Činidlá A a B sú stabilné pri izbovej teplote.
2. Činidlo **C** sa pripraví zmiešaním 100 objemových dielov činidla A a 2 obj. dielov činidla B. Činidlo **C** je jablkovo zelené a je stabilné 1 týždeň pri izbovej teplote.
3. Do 100 µl vzorky obsahujúcej 10-120 µg proteínu (0,1-1,2 mg proteínu/ml) pridaj 2 ml činidla **C**.
4. Zmiešaj a nechaj stáť 30 min pri 37 °C.
5. Zmeraj absorbanciu pri 562 nm. Porovnávací roztok obsahuje 100 µl tlmivého roztoku opracovaného podľa bodov 3 a 4.

TABUĽKA 2.5B BCA microassay metóda

1. Zásobné roztoky činidiel: **A**, 8 % w/v Na₂CO₃, 1,6% w/v NaOH, 1,5 % w/v vínan sodný a dostatočné množstvo pevného NaHCO₃ na úpravu pH na hodnotu 11,25. **B**, 4 % w/v BCA-Na₂. Činidlá A a B sú stabilné pri izbovej teplote. Činidlo **C**, 4 obj. diely CuSO₄·5H₂O zmiešané so 100 obj. dielmi činidla B. Toto činidlo by malo byť pripravené vždy čerstvé.
2. Zásobný roztok činidla **D** sa pripraví v čase potreby zmiešaním 1 obj. dielu činidla **C** s 1 obj. dielom činidla **A**.
3. Do 1 obj. dielu vzorky (0,5-10 µg proteínu/ml) pridaj 1 obj. diel činidla **D**.
4. Zmiešaj a nechaj stáť 60 min pri 60 °C.
5. Ochlad' na izbovú teplotu.
6. Zmeraj absorbanciu pri 562 nm. Porovnávací roztok obsahuje 100 µl tlmivého roztoku opracovaného podľa bodov 3 až 5.

Pretože mechanizmus BCA metódy je v blízkom vzťahu s Lowryho metódou, dá sa očakávať podobná citlivosť oboch metód na aminokyselinové zloženie proteínu. Špeciálnou výhodou BCA metódy je vo všeobecnosti jej väčšia tolerancia voči zlúčeninám, ktoré interferujú s Lowryho metódou. BCA metóda je menej citlivá na prítomnosť rôznych detergentov

(aniónových, neiónových a zwitteriónových), ktoré sa často používajú pri rozpúšťaní proteínov. Denaturačné činidlá – ako GdmHCl a močovina sú tiež dobre tolerované, avšak BCA metóda je citlivejšia na prítomnosť redukujúcich cukrov. Samozrejme, meď-chelatujúce činidlá ako napr. EDTA, sú vážnym problémom pre obidve metódy, podobne ako aj činidlá, ktoré ovplyvňujú pH činidiel používaných v BCA a Lowryho metóde, a tým ovplyvňujú optimálne pH daných metód.

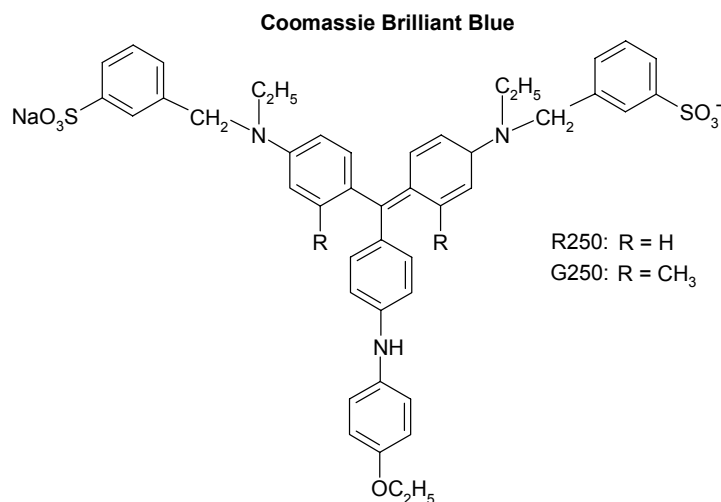
Bradfordova metóda – viazanie farbičky

Za vhodných podmienok, kyslé a bázické skupiny proteínov interagujú s disociovanými skupinami organických farbív za vzniku farebných zrazenín. Tento jav môže byť využitý pri kvantitatívnej analýze, ale mnoho farbičiek (napr. Orange G) sú necitlivé, zatiaľ čo iné (napr. Amidočern 10-B) má iné nevýhody. Tento prístup sa stal populárnym vďaka *Bradford* vyvinutej metóde, ktorá využíva farbičku Coomassie Brilliant Blue G 250 alebo R 250. Viazanie farbičky do proteínu spôsobuje posun jej absorpčného maxima z 465 nm (červená forma) na 595 nm (modrá forma). Farbička sa pripravuje ako zásobný roztok rozpustením v fosforečnej alebo chloristej (stabilnejší roztok) kyseline. Metóda popísaná v **tabuľke 2.6** je rýchla, jednoduchá jedнокroková procedúra, pri ktorej je činidlo pridané ku vzorke a absorbancia je meraná pri 595 nm. Problémom danej metódy je tendencia komplexu proteín-farbička viazať sa na povrch skla. Je preto vhodné používať jednorazové kvety, ale na druhej strane je relatívne jednoduché odstrániť farbičku zo skla ponorením kvety do roztoku 0,1 M HCl alebo umytím koncentrovaným detergentom a následne vodou alebo acetónom.

Metóda je veľmi citlivá, pracuje v rozmedzí 0,2-1,4 mg proteínu/ml – štandardná metóda – a v rozmedzí 5-100 µg proteínu/ml v prípade *microassay* procedúry. Je veľmi závislá od primárnej štruktúry proteínov v dôsledku preferenčnej interakcie farbičky s bázickými (predovšetkým arginínovými) aminokyselinovými zvyškami. Výsledok môže byť ovplyvnený prítomnosťou detergentov, niektorými tlmivými roztokmi (napr. Tris) a polyolmi, podobne, avšak v menšom rozsahu, ako Lowryho metóda. Navyše, niektoré proteíny môžu byť relatívne nerozpustné v takom kyslom prostredí.

TABUĽKA 2.6 Bradfordova metóda – viazanie farbičky

1. Činidlá: intenzívnym miešaním rozpustíme 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 v 50 ml 95 % etanolu. Tento roztok sa zmieša so 100 ml 85 % w/v kyseliny fosforečnej, zriedi sa s vodou na 1 liter a prefiltruje sa. Činidlo je stabilné pri izbovej teplote po dobu minimálne 2 týždňov.
 2. **Štandardná metóda:** pridaj 5 ml činidla do 0,1 ml vzorky s proteínom obsahujúcej 20-140 µg proteínu (0,2-1,4 mg proteínu/ml),
alebo
Microassay metóda: pridaj 0,2 ml činidla do 0,8 ml vzorky obsahujúcej 1-20 µg proteínu (5-100 µg proteínu/ml).
 3. Zmiešaj a nechaj stáť po dobu 5-30 min.
 4. Zmeraj absorbanciu pri 595 nm. Porovnávací roztok obsahuje 0,1 ml (0,8 ml v prípade *microassay*) tlmivého roztoku a 5 ml (0,2 ml pre *microassay*) činidla.
-



Farbenie striebrom

Metódy popísané doteraz sú dostatočné pre stanovenie koncentrácie proteínov pre väčšinu bežných purifikačných (čistiacich) metód. Avšak, v súčasnosti sú v centre záujmu proteíny, ktoré sprostredkujú procesy proliferácie a diferenciácie, ktoré sú aktívne pri koncentráciách 10^{-9} - 10^{-13} M. Izolácia takýchto proteínov je značne komplikovaná a proteíny sa získavajú iba vo veľmi malých koncentráciách (napríklad zo 150 litrov média je možné získať iba 2-10 μ g interleukínu 3). Bežné metódy by spotrebovali značnú časť tohto proteínu. V súčasnosti bola preto vyvinutá vysoko-citlivá metóda, založená na schopnosti viazať striebro, schopnosť, ktorá sa už bežne efektívne využíva na citlivú detekciu proteínov separovaných polyakrylamidovou gélovou elektroforézou (**obrázok 2.5**, strana 27).

Touto metódou je možné určiť proteín v množstve 15 ng až 2 μ g (150 ng až 20 μ g proteínu/ml), čo reprezentuje približne 100-krát väčšiu citlivosť ako predchádzajúce metódy. Metóda je popísaná v **tabuľke 2.7**.

TABUĽKA 2.7 Farbenie striebrom

1. Zásobné roztoky činidiel: **A**, 7,5 % w/v Tween 20, 100 mM Tris, 100 mM Na₂CO₃. **B**, 2,5 % roztok glutaraldehydu denne čerstvo pripravený zo zásobného roztoku 25 % glutaraldehydu uchovávaného pri 4 °C. **C**, Amoniakálny roztok striebra denne čerstvo pripravený pridaním 20 % w/v NaOH a koncentrovaného NH₄OH (19 %) do 18,2 ml destilovanej vody, s následným pridaním po kvapkách 0,2 ml 20 % w/v dusičnanu strieborného. **D**, 3 % w/v tiosulfátu sodného denne čerstvo pripraveného.
 2. Pridaj 11 μ l činidla A do 100 μ l vzorky obsahujúcej proteín od 15 ng do 2 μ g (150 ng až 20 μ g proteínu/ml).
 3. Centrifuguj pri 450 g počas 5 minút cez 2-ml Bio-Gel P-2 kolónu pre-ekvilibrovanú v 10-krát zriedenom činidle A.
 4. Pridaj 0,9 ml destilovanej vody ku vzorke na výsledný objem 1 ml.
 5. Pridaj 20 μ l činidla B a zamiešaj vortexom 2 sec.
 6. Pridaj 200 μ l činidla C a zamiešaj vortexom 2 sec.
 7. Nechaj stáť presne 10 minút pri izbovej teplote.
 8. Pridaj 40 μ l činidla D.
 9. Zmeraj absorbanciu pri 420 nm. Porovnávací roztok obsahuje 100 μ l použitého tlmivého roztoku opracovaného podľa bodov 2 až 8.
-

Farbenie striebrom vykazuje rozdielnu citlivosť na primárne zloženie proteínov obdobne ako v prípade Bradfordovej metódy. Vážnym problémom pri takejto *microassay* metóde je strata proteínu v dôsledku jeho adsorpcie na sklenných a plastových povrchoch. Táto adsorpcia môže byť minimalizovaná pridaním detergentu (Tween 20) ku vzorke pred jej opracova-

ním. Ďalším vážnym problémom je interferencia viacerých zložiek bežne prítomných vo vzorke a tlmivých roztokoch s danou metódou, vrátane aniónov (napr. Cl⁻), ktoré tvoria nerozpustné strieborné soli, EDTA, SDS v koncentráciach nad 0,01 % a redukčné činidlá ako ditiotreitol a 2-merkaptoetanol. Je preto zvyčajne potrebné nevyhnutne odstrániť akékoľvek potenciálne interferujúce reagenty zo vzorky gélovou filtráciou cez malú Bio-Gel P-2 kolónu. Treba poznamenať, že striebrom opracovaná vzorka ponechaná v kyvete niekoľko minút, spôsobí vytvorenie strieborného skla na stenách kyvety. To môže byť ľahko odstránené kyselinou dusičnou. Táto metóda je veľmi citlivá, ale mala by sa využívať iba v prípade nedostatku materiálu, keď nie je možné použiť alternatívne metódy.

Vzhľadom na množstvo metód pre určovanie koncentrácie proteínov môže byť pri jej výbere nápomocná schéma uvedená na nasledujúcej strane.

Použitá literatúra

- Protein purification methods, a practical approach (Ed. E.L.V. Harris & S. Angal), Oxford university Press, New York 1989.
- Podhradský D., Mihalovová H.: Praktické cvičenie z biochémie, Košice 1989.
- Eaton D.C.: Laboratory investigations in organic chemistry, McGraw-Hill, Inc., New York 1989.
- Creighton T.E.: Proteins structures and molecular properties, 2nd edition, W.H. Freeman and Company, New York 1993.
- Stryer L.: Biochemistry, 4th edition, W.H. Freeman and Company, New York 1995.

Schéma pre výber vhodnej metódy na zistenie koncentrácie proteínu (Noble J. E. & Bailey M. J. A., 2009, Quantitation of protein. *Methods in Enzymology* **463**, 73-95):

